

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DAS ESPÉCIES *Banara parviflora*
(A.Gray) Benth., *Calea phyllolepis* Baker e *Verbesina subcordata* DC.**

MARIA IZABEL GOULARTE MORITZ

Florianópolis, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DAS ESPÉCIES *Banara parviflora*
(A.Gray) Benth., *Calea phyllolepis* Baker e *Verbesina subcordata* DC.

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Farmácia como
requisito parcial para obtenção do grau
de mestre em Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel

MARIA IZABEL GOULARTE MORITZ

**Florianópolis - SC
2010**

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à UFSC, ao Programa de Pós-graduação em Farmácia e ao CNPq pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado.

Ao Professor Eloir Paulo Schenkel, meu orientador, pelos cinco anos de muita paciência, ensinamentos e carinho.

À Professora Miriam, que me ensinou toda a base e me ensinou a amar a química de produtos naturais;

Agradeço aos Professores Miguel S. B. Caro, Jorge Alejandro Palermo, Gabriela Cabrera e Norberto Peporine Lopes pelas análises instrumentais realizadas, pelo bom trabalho, ensinamentos e ajuda com a elucidação estrutural. Ao Professor Eloir e ao Professor Sérgio Bordignon pelas coletas e identificação das plantas estudadas nessa dissertação.

À Silvana e Karen com quem dividi muito da minha vida, convivendo no laboratório e aprendendo juntas de tudo um pouco. Aos amigos Flora, Clara e Leopoldo meus colegas de Iniciação científica que serão para sempre meus amigos por todos os momentos que dividimos e pelo carinho que se criou dentro de nós.

À Solange por sempre estar pronta para ajudar. Ao Professor Flávio pela motivação e toda a ajuda. Aos amigos e também colegas de laboratório Simone, Teca, Solomon, Vanessa, Caroline, Thais, Virgínia, Carlos, Cassandra, Geison, Andressa, Samanta e Cíntia. Àquela com quem dividi cada dia e cada momento do mestrado, minha amiga Tatiana. E à Fernanda, amiga. Agradeço à Lara, iniciação científica do laboratório, que me ajudou muito com seu trabalho, dedicação e responsabilidade, e obrigada por sua amizade e companheirismo. À Carize, sempre amiga e colega. A todos vocês, meus amigos, minha segunda família que cresceu tanto nesses últimos anos. Por tudo que vivemos juntos, amo Vocês!

E por fim, aos meus amigos e à minha família, em especial minha mãe que está sempre do meu lado, aos meus irmãos e minha sobrinha querida Laís, meu pai e meus avós. A todos esses por sempre me escutar, me emprestando o ombro e me fazendo ver que tudo é passageiro e que estou fazendo tudo que realmente é o que eu mais quero fazer. Amo vocês!

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	5
2.1	OBJETIVO GERAL	5
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3.1	GÊNERO CALEA L.	6
3.1.1	<i>Dados botânicos.....</i>	6
3.1.2	<i>Usos populares.....</i>	6
3.1.3	<i>Constituintes químicos.....</i>	7
3.1.4	<i>Atividades biológicas descritas</i>	10
3.2	GÊNERO BANARA AUBL.	10
3.2.1	<i>Dados botânicos.....</i>	10
3.2.2	<i>Usos populares.....</i>	11
3.2.3	<i>Constituintes químicos e atividades biológicas descritas.....</i>	11
3.3	GÊNERO VERBESINA L.	12
3.3.1	<i>Dados botânicos.....</i>	12
3.3.2	<i>Usos populares.....</i>	12
3.3.3	<i>Constituintes químicos e atividades biológicas</i>	12
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1	MATERIAL VEGETAL	15
4.2	PROCEDIMENTOS GERAIS	15
4.3	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	17
4.4	CALEA PHYLLOLEPIS BAKER	18
4.4.1	<i>Isolamento, purificação e identificação da substância CA1 e CA1acetilada</i>	18
4.4.1.1	Fracionamento sobre coluna tipo <i>flash</i> : Coluna 1CP	18
4.4.1.2	Fracionamento em coluna de carvão ativo: Coluna 2CP	19
4.4.1.3	Fracionamento sobre coluna de Sephadex LH-20: Coluna 3CP19	20
4.4.1.4	Acetilação da fração CP1	20
4.5	BANARA PARVIFLORA (A. GRAY) BENTH.	20
4.5.1	<i>Isolamento, purificação e identificação das substâncias B9, B10 E BT2.....</i>	20
4.5.1.1	Fracionamento em coluna tipo <i>flash</i> : Coluna 1BP	20
4.5.1.2	Fracionamento em coluna de carvão ativo: Coluna 2BP	21
4.5.1.3	Fracionamento sobre coluna de Sephadex LH-20: Coluna 3BP22	22

4.5.1.4	Fracionamento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência: Coluna 4BP	22
4.5.1.5	Purificação das frações BV3 e BV4: Coluna 5BP	23
4.5.1.6	Purificação através de Cromatografia em camada delgada preparativa 1	23
4.6	VERBESINA SUBCORDATA DC	24
4.6.1	<i>Isolamento, purificação da substância SV1</i>	24
4.6.1.1	Fracionamento em coluna tipo flash: Coluna 1VS.....	24
4.6.1.2	Fracionamento da fração 32-35 em coluna de Sephadex LH-20: Coluna 2VS	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1	INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DAS ESPÉCIES CALEA PHYLLOLEPIS BAKER, BANARA PARVIFLORA BENTH. E VERBESINA SUBCORDATA DC.	26
5.1.1	<i>Investigação química de Calea phyllolepis Baker</i>	27
5.1.1.1	Rendimento dos extratos.....	27
5.1.1.2	Isolamento, purificação e identificação da substância CA1 E CA1acetilada	28
5.1.1.3	Elucidação estrutural das substâncias CA1 E CA1 acetilada....	29
5.1.2	<i>Investigação química de Banara parviflora (A.Gray) Benth.</i> 43	
5.1.2.1	Rendimento dos extratos.....	43
5.1.2.2	Análise cromatográfica, isolamento e purificação das frações..	44
5.1.2.3	Elucidação estrutural da substância BT2	47
5.1.2.4	Elucidação estrutural da substância B9.....	49
5.1.3	<i>Investigação química de Verbesina subcordata DC.</i>	66
5.1.3.1	Rendimento dos extratos.....	67
5.1.3.2	Análise cromatográfica, isolamento e purificação das frações de <i>Verbesina subcordata</i> DC	67
5.1.3.3	Elucidação estrutural das substâncias SV1	68
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
7	CONCLUSÕES	86
8	REFERÊNCIAS	87

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estruturas de ascaridol e derivados do <i>p</i> -mentano	1
FIGURA 2: Estruturas da artemisinina e do artesunato	2
FIGURA 3: Hidropéroxidos de sesquiterpenos isolados de <i>Artemisia stolonifera</i>	3
FIGURA 4: Substâncias relatadas para a espécie <i>C. platylepis</i> Sch.Bip.ex Baker	7
FIGURA 5: 7-O-(α -l-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2))- β -D-glicopiranosil-3',4',7'-trihidroxiflavona, substância relatada para a espécie <i>Calea clauseniana</i>	8
FIGURA 6: Lactona sesquiterpênica do tipo germacranolídeo relatada para a espécie <i>Calea urticifolia</i>	8
FIGURA 7: Eupatoriocromeno e precoceno de <i>Calea serrata</i>	8
FIGURA 8: Substâncias descritas para <i>Calea hispida</i>	9
FIGURA 9: Hidroperóxido derivado do costol e hidroperóxido de 8 β , 12-eudesmanolídeo..	9
FIGURA 10: Cinamato de 5-hidróxi-2-isopropil-4a-metil-8metilen-decahidronaftalen-1-ila (SV1b)	13
FIGURA 11: Amorfano e o verocefol, substâncias descrita para <i>Verbesina sphaerocephala</i> A. Gray	13
FIGURA 12: Foto da espécie <i>C. phyllolepis</i> no município de taquarí. Autor: Sérgio Bordignon	15
FIGURA 13: Esquema de fracionamento do extrato diclorometano dos ramos de <i>C.phyllolepis</i>	18

FIGURA 14: Esquema de fracionamento do extrato etanólico das folhas de *B. parviflora* 21

FIGURA 15: Cromatografia em camada delgada dos extratos diclorometano de *V. subcordata*, *B. parviflora* e *C. phyllolepis* 26

FIGURA 16: Rendimento dos processos de extração das folhas e ramos de *C. phyllolepis* 28

FIGURA 17: A) Análise cromatográfica das frações da coluna 2BP de *C. phyllolepis*; B) Análise cromatográfica da fração CP1 acetilada e fração CP1 da coluna 2BP. 29

FIGURA 18: Espectro de RMN de ^1H da substância CA1 acetilada 30

FIGURA 19: Espectro de RMN de ^1H da substância CA1 acetilada, ampliado entre δ 4,50 e δ 5,25 31

FIGURA 20: Espectro de RMN de ^1H da substância CA1 acetilada, ampliado entre δ 6,3 e δ 7,7 32

FIGURA 21: Espectro de RMN de ^{13}C da substância CA1 acetilada, ampliado entre δ 10 e δ 75. 33

FIGURA 22: Espectro de RMN de ^{13}C da substância CA1 acetilada, ampliado entre δ 105 e δ 175 33

FIGURA 23: Espectro de correlação HSQC-DEPT da substância CA1 acetilada em CDCl_3 34

FIGURA 24: espectro de correlação HMBC da substância CA1 acetilada em CDCl_3 36

FIGURA 25: Acoplamentos de HMBC e COSY ^1H - ^1H da porção cinamato da substância CA1 acetilada 37

FIGURA 26: Espectro de correlação ^1H - ^1H da substância CA1 acetilada 37

FIGURA 27: Acoplamentos de HMBC e COSY ^1H - ^1H da porção terpênica da substância CA1 acetilada 38

FIGURA 28: acoplamentos observados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e de correlação de COSY e de HMBC	39
FIGURA 29: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de CA1 em CDCl_3	40
FIGURA 30: Espectro de RMN de ^{13}C de CA1 em CDCl_3	41
FIGURA 31: Cromatografia em camada delgada das frações da coluna BP1 (BV1-BV8)	44
FIGURA 32: Cromatografia líquida de alta eficiência da substância B9 no modo preparativo	45
FIGURA 33: Cromatografia em camada delgada da substância B9 semi-purificada e extrato etanólico de <i>B. parviflora</i>	46
FIGURA 34: Espectro de ultravioleta da substância B10 (orientina) em metanol	47
FIGURA 35: Estrutura do flavonóide C-glicosídeo orientina	47
FIGURA 36: Cromatografia em camada delgada das frações da coluna em fase reversa 5BP	48
FIGURA 37: RMN de ^1H da substância BT2 em CDCl_3	48
FIGURA 38: Espectro de RMN de ^1H da substância BT2 em CDCl_3 , ampliação da região entre δ 4,0 e δ 5,6	49
FIGURA 39: Estrutura do fitol	49
FIGURA 40: Espectro de infravermelho da substância B9 obtido na forma de pó com KBr através de reflectância difusa.	50
FIGURA 41: Espectro de ultravioleta da substância B9 em metanol	51
FIGURA 42: Espectro de RMN ^{13}C da substância B9 em CDCl_3	52

- FIGURA 43:** Espectro de RMN ^{13}C da substância B9 em CDCl_3 , ampliação da região entre δ 125 e δ 136 52
- FIGURA 44:** Espectro de correlação HSQC-DEPT 135° da substância B9 em CDCl_3 53
- FIGURA 45:** Espectro de RMN ^1H da substância B9 em CDCl_3 , ampliação de região entre δ 6,7 e δ 8,0 54
- FIGURA 46:** Espectro de $\text{rmn } ^1\text{h}$ da substância B9 em CDCl_3 54
- FIGURA 47:** Espectro de correlação ^1H - ^1H da substância B9 em CDCl_3 55
- FIGURA 48:** Acoplamentos observados nos espectros de correlação ^1H - ^1H da substância B9 55
- FIGURA 49:** Acoplamentos observados nos espectros de RMN ^1H de correlação ^1H - ^1H ; espectro de correlação ^1H - ^1H em CDCl_3 56
- FIGURA 50:** Acoplamentos observados nos espectros de correlação ^1H - ^1H ; espectro de correlação ^1H - ^1H em CDCl_3 56
- FIGURA 51:** Espectro de correlação HMBC da substância B9 em CDCl_3 57
- FIGURA 52:** Espectro de correlação HMBC da substância B9 em CDCl_3 58
- FIGURA 53:** Acoplamentos observados nos espectros de correlação de HMBC da substância B9 58
- FIGURA 54:** Espectro de NOESY da substância B9 em CDCl_3 59
- FIGURA 55:** Espectro de massas (APPI) da substância B9 61
- FIGURA 56:** Espectro de massas MS2 do íon 396 (APPI) da substância B9. 61

FIGURA 57: Proposta de fragmentação da molécula protonada m/z 396 ao íon m/z 378 da substância B9 através dos experimento MS2 (APPI) 62

FIGURA 58: Proposta de fragmentação da molécula protonada m/z 396 ao íon m/z 354 da substância B9 através dos experimento MS2 (APPI) 62

FIGURA 59: Proposta de fragmentação do fragmento m/z 378 ao íon m/z 336 da substância B9 através dos experimento MS2 (APPI) 63

FIGURA 60: Proposta de fragmentação da molécula protonada m/z 396 ao íon m/z 274 da substância B9 através dos experimento MS2 (APPI) 63

FIGURA 61: Espectro de massas MS2 do íon 354 (APPI) da substância B9 64

FIGURA 62: Fragmentação do íon m/z 354 ao íon m/z 162 pelo procedimento de MS2 (APPI). 64

FIGURA 63: Estrutura da substância isolada de *B. parviflora* B9 65

FIGURA 64: Estrutura da substância n1,n8–dibenzoileespermidina. 65

FIGURA 65: Análise cromatográfica do extrato diclorometano de *V. subcordata* e das substâncias isoladas SV1 e CA1 67

FIGURA 66: Espectro de RMN ^1H das substâncias SV1a e SV1b em CDCl_3 . 69

FIGURA 67: Espectro de RMN ^1H das substâncias SV1a e SV1b em CDCl_3 , ampliação da região entre δ_{H} 0 e δ_{H} 1,8. 69

FIGURA 68: espectro de correlação HSQC-DEPT 135° em CDCl_3 , ampliação da região entre δ_{H} 0 e δ_{H} 3,0 e δ_{C} 0 e δ_{C} 60 70

FIGURA 69: Espectro de correlação HSQC-DEPT 135° em CDCl_3 , ampliação da região entre δ_{H} 4,4 e δ_{H} 6,0 e δ_{C} 60 e δ_{C} 130 70

FIGURA 70: Espectro de RMN ^1H das substâncias SV1a E SV1b em CDCl_3 .ampliação da região entre δ 6,4 e δ 8,0. 71

FIGURA 71: Espectro de RMN ^1H das substâncias SV1a e SV1b em CDCl_3 , ampliação entre δ 3,3 e δ 5,8 72

FIGURA 72: Espectro de COSY da substância SV1 em CDCl_3 : ampliação 73

FIGURA 73: Espectro de COSY da substância SV1 em CDCl_3 : ampliação 73

FIGURA 74: espectro de correlação HMBC da substância SV1 em CDCl_3 . 74

FIGURA 75: Ampliação da região entre δ 3,2 e δ 3,7 do RMN ^1H das substâncias SV1a e SV1b em CDCl_3 74

FIGURA 76: Acoplamentos de COSY e HMBC da substância SV1a 75

FIGURA 77: Acoplamentos de COSY e HMBC da substância SV1b 75

FIGURA 78: Estruturas parciais das substâncias SV1b E SV1a 77

FIGURA 79: Estrutura das substâncias cinamato do 1-hidróxi-6-epi- α -verbesinol e cinamato de 1-hidróxi-6-epi- β -verbesinol . 78

FIGURA 80: Biossíntese do sesquiterpeno do tipo eudesmano. 79

FIGURA 81: Sesquiterpenos do tipo eudesmano 79

FIGURA 82: Estruturas de substâncias das espécies de esponjas do gênero *Plakortis* e *diacarnus*. 80

FIGURA 83: Hidroperóxido do sesquiterpeno do tipo cinamoil-eudesmano isolado da espécie *Verbesina subcordata* DC 82

FIGURA 84: Estrutura das substâncias isoladas de *C. phyllolepis* e *V. subcordata* CA1, SV1b e SV1a. 82

FIGURA 85: Estrutura da substância isolada de *B. parviflora* B10 83

FIGURA 86: Estrutura da substância isolada de *B. parviflora* B9 83

FIGURA 87: Estruturas das substâncias putrescina e espermidina 84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Dados de RMN de ^{13}C E ^1H da substância CA1 acetilada obtidos através dos espectros de RMN de ^{13}C , ^1H e HSQC DEPT 135° (500 e 125 MHz)	35
TABELA 2: Comparação dos dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância CA1 e da literatura	42
TABELA 3: Rendimento dos extratos de <i>B. parviflora</i>	43
TABELA 4: Dados de RMN de ^{13}C E ^1H da substância B9 e correlações observados nos espectros de COSY, NOESY e HMBC	60
TABELA 5: Dados de RMN de ^{13}C E ^1H da substância B9 e da literatura	66
TABELA 6: Rendimento dos extratos de <i>V. subcordata</i>	67
TABELA 7: Dados obtidos através de RMN ^1H , ^{13}C e correlações (500 e 125 MHz) da substância SV1a em CDCl_3 .	76
TABELA 8: Dados obtidos através de RMN ^1H , ^{13}C e correlações (500 e 125 MHz) da substância SV1b em CDCl_3	76

LISTA DE ABREVIATURAS

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

RMN ^1H : Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

RMN ^{13}C : Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

COSY: Correlation Spectroscopy

NOESY: The Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

ABSTRACT

Peroxy natural products isolated from plant have shown promising biological activities and some of them are successfully used in therapy. In this context, this work is directed to isolation and identification of compounds obtained, with emphasis on peroxides, from plants occurring in southern Brazil, aiming to obtain new substances with potential therapeutic interest in treating diseases. We investigated the species *Calea phyllolepis* Baker and *Verbesina subcordata* DC. (Asteraceae) and the specie *Banara parviflora* (A. Gray) Benth (Salicaceae,). Dichloromethane and ethanol extracts of fresh aerial parts of these three species were obtained and analyzed by thin layer chromatography. Various column chromatographic procedures with different materials (silica gel, reversed-phase silica gel and Sephadex LH-20) and HPLC resulted in the isolation of compounds of the three species studied, but none peroxide could be isolated in sufficient quantity to the structural elucidation. On the other hand, the chromatographic procedures resulted in the isolation of substances from these three species. For stems of *C. phyllolepis*, a sesquiterpene was isolated and identified based on spectroscopic analysis as a coumarate of 6-epi- β -verbesinol. Sesquiterpene with the same skeleton were also obtained from the leaves of *V. subcordata*. And elucidated as the isomers cinnamate of 1-hydroxy-6-epi- β -verbesinol and 1-hydroxy- 6-epi - α -verbesinol. From the ethanolic extract of the leaves of *B. parviflora*, the flavonoid C-glycoside orientin and a spermidine derivative were isolated and identified. The structure of this last compound was elucidated using NMR bidimensional experiments (H-C and H-H correlations spectra, DEPT-HSQC and HMBC) and High resolution Mass Spectrometry as N1, N8-dibenzoil spermidil-N4-acetamide, a new substance. The isolation of these substances is important for the chemical characterization of the studied species, especially *B. parviflora* and *C. phyllolepis* for which there are no reference studies in the databases available.

RESUMO

Muitos peróxidos isolados de espécies vegetais têm apresentado promissoras atividades biológicas e alguns deles são utilizados com sucesso na terapêutica. Nesse contexto, o presente trabalho está direcionado ao isolamento e identificação de compostos obtidos, com ênfase em peróxidos, a partir de plantas de ocorrência na região sul do Brasil, com o intuito de obter novas substâncias de potencial interesse terapêutico no tratamento de doenças. Dentre essas plantas, são utilizadas neste estudo as espécies pertencentes à família Asteraceae, *Calea phyllolepis* Baker e *Verbesina subcordata* DC. e a espécie pertencente à família Salicaceae, *Banara parviflora* (A.Gray) Benth. Os extratos diclorometano e etanólico das partes aéreas frescas das três espécies foram obtidos e analisados por cromatografia em camada delgada. Os diversos procedimentos cromatográficos em coluna com diferentes resinas (gel de sílica, gel de sílica de fase reversa e Sephadex LH-20) e por CLAE resultaram no isolamento de compostos das três espécies estudadas, mas nenhuma de classe dos peróxidos por resultarem quantidades insuficientes para a elucidação estrutural e/ou degradação antes ou durante a realização de espectros por sua baixa estabilidade. Por outro lado, resultaram no isolamento de substâncias das três espécies. Para *Calea phyllolepis* Baker foi isolado o cumarato de 6-*epi*- β -verbesinol; sesquiterpenos do mesmo esqueleto foram isolados da espécie *Verbesina subcordata* DC., os isômeros cinamato de 1-hidróxi-6-*epi*- β -verbesinol e 1-hidróxi-6-*epi*-- α -verbesinol. Do extrato etanólico das folhas de *B. parviflora* foram isolados o flavonóide C-glicosídeo orientina e o derivado da espermidina N¹,N⁸-dibenzoilespermidil-N⁴-acetamida, apesar de já serem conhecidos derivados da espermidina em plantas, esse derivado acetilado da espermidina ainda não foi descrito na literatura. O isolamento dessas substâncias é importante para a caracterização química das espécies estudadas, principalmente de *B. parviflora* e *C. phyllolepis* pela ausência de estudos químicos nas bases de dados disponíveis.

1 INTRODUÇÃO

Muitos peróxidos isolados de espécies vegetais têm apresentado promissoras atividades antiparasitária e antitumoral, sendo alguns deles utilizados com sucesso na terapêutica, os exemplos mais conhecidos são a artemisinina e seus derivados, amplamente utilizados como antimaláricos em todo o mundo, e o ascaridol utilizado como anti-helmíntico (TOLSTIKOV et al., 1996; MESHNICK et al., 1996; CASTEEL, 1999; DEMBITSKY, 2008).

Um dos primeiros peróxidos de emprego terapêutico é o ascaridol, um endoperóxido isolado em 1912, conhecido por sua atividade anti-helmíntica. O ascaridol e quatro monoterpenóides do tipo *p*-mentano contendo grupamento hidroperóxido (figura 1) foram isolados das partes aéreas de *Chenopodium ambrosioides* L., apresentaram atividade tripanocida contra *Trypanosoma cruzi*, apresentando os compostos contendo o grupo hidroperóxido maior atividade do que o endoperóxido ascaridol. Quando comparada à atividade dos hidroperóxidos com seus respectivos alcoóis, pôde-se verificar que a atividade tripanocida destes compostos está vinculada à presença do grupamento hidroperóxido (KIUCHI et al., 2002).

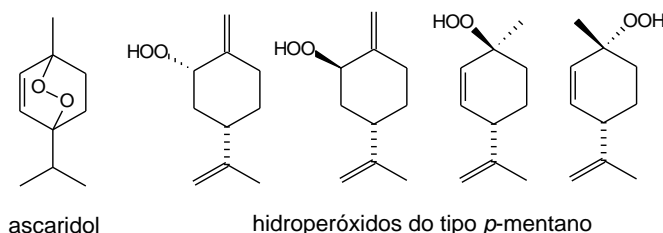


Figura 1: Estruturas de ascaridol e derivados do *p*-mentano.

Outro peróxido importante é a artemisinina (figura 2), isolada de *Artemisia annua* em 1972. Após alguns testes com animais, ainda no ano de 1972, a artemisinina e seus derivados foram administrados em cerca de 6000 humanos infectados com malária em dez regiões da China. Além da atividade antimalárica, esses compostos apresentam-se promissores no tratamento de diversas doenças após a descoberta de novas atividades biológicas para estes compostos, como, por exemplo,

atividade antiviral, antitumoral e imunossupressora (EFFERTH et al., 2002a; NOORI et al., 2004; SEOKJOON, 2007). Entre seus derivados destaca-se um hemiêster succínico da artemisinina, o artesunato (Figura 2), comumente utilizado no tratamento dos casos severos da malária, que vem apresentando resultados promissores como agente antiviral e antitumoral (EFFERTH et al., 2001; EFFERTH et al., 2002; KAPTEIN et al., 2006).

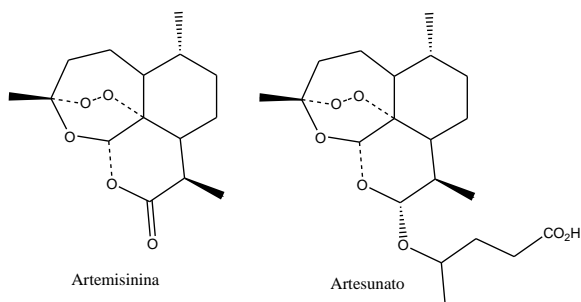


Figura 2: Estruturas da artemisinina e do artesunato

Nesse contexto, o presente trabalho está direcionado ao isolamento e identificação de compostos obtidos a partir de plantas de ocorrência na região sul do Brasil, com o intuito de obter nova fonte de substâncias de potencial interesse terapêutico no tratamento de doenças. Os dados aqui apresentados apontam o interesse que essa classe de substâncias vem despertando, especialmente em relação à atividade antiparasitária, mais especificamente frente a protozoários, responsáveis por doenças negligenciadas e para as quais o arsenal terapêutico ainda é pouco efetivo.

Em relação à obtenção de novos compostos contendo grupamento peróxido a partir de fontes naturais, o Brasil apresenta uma vantagem em relação a outros países por possuir uma grande diversidade de espécies vegetais (GIULIETTI et al., 2005), o que tornam promissoras as chances de se obter novas substâncias com potencial aplicação terapêutica, ainda mais se considerarmos que apenas 15 a 20% das plantas terrestres foram avaliadas quanto ao seu potencial farmacêutico (SOEJARTO et al., 2005).

Através da triagem realizada por Schenkel et al. (2002), foi possível detectar a presença de peróxidos em 71 espécies vegetais de ocorrência na região sul do Brasil, de um total de 357 espécies analisadas. Das espécies que apresentaram resultado positivo, a maioria não foi estudada até o momento, sendo que foram isolados peróxidos de apenas 5 delas: *Artemisia alba* (APPENDINO, GARIBOLDI, MENICHINI, 1985), *Verbesina subcordata* (JAKUPOVIC et al., 1987), *Heterothalamus psiadioides* (RÜCKER et al., 1991; MAREK, 1994), *Heterothalamus alienus* (MAREK, 1994; RÜCKER et al., 1996a) e *Senecio selloi* (HEINZMANN, 1996; RÜCKER et al., 1996b; RÜCKER et al., 2003). Entre as atividades biológicas relatadas para alguns dos peróxidos isolados dessas plantas, estão: atividade antimalárica in vitro frente *Plasmodium falciparum* de derivados do 1,4-epidioxi-bisabola-2,12-dieno, isolado das espécies provenientes do Brasil *Heterothalamus psiadioides*, *H. alienus*, *Kaunia rufescens* e *Senecio selloi* (RÜCKER et al., 1996b; RÜCKER et al., 1997) e citotóxica dos hidroperóxidos de sesquiterpenos (figura 3) isolados de *Artemisia stolonifera* frente a células tumorais humanas das linhagens A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498 E HCT15 (KWON, CHOI, LEE, 2000).

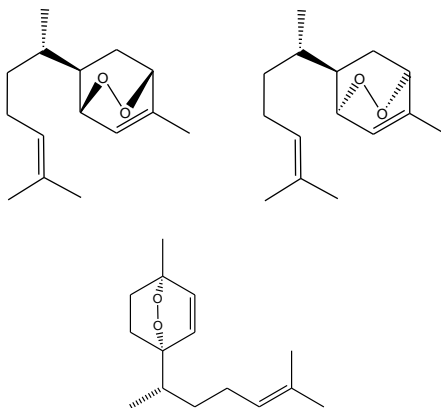


Figura 3: Hidroperóxidos de sesquiterpenos isolados de *Artemisia stolonifera*

Baseado nos resultados já apresentados pelas cinco espécies analisadas é possível esperar que outras espécies que apresentaram resultado positivo na mesma triagem, tenham chance de fornecer novos peróxidos com potenciais atividades biológicas de interesse.

As plantas utilizadas nesse estudo são as espécies pertencentes à família Asteraceae, *Calea phyllolepis* Baker e *Verbesina subcordata* DC. e a espécie pertencente à família Salicaceae *Banara parviflora* (A.Gray) Benth.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

O presente trabalho foi desenvolvido tendo como objetivo a busca, o isolamento e elucidação estrutural de componentes, especialmente peróxidos presentes em espécies vegetais de ocorrência na região sul do Brasil, pré-selecionadas a partir de investigação anterior.

2.2 *Objetivos específicos*

- Caracterizar os componentes químicos do extrato etanólico das folhas de *Banara parviflora* (A.Gray) Benth

- Caracterizar os componentes químicos do extrato diclorometano das folhas de *Verbesina subcordata* DC.

- Caracterizar os componentes químicos do extrato diclorometano dos ramos de *Calea phyllolepis* Baker.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Gênero *Calea* L.

3.1.1 Dados botânicos

O gênero *Calea* L.(Asteraceae, tripo Heliantheae, subtribo Melampodiinae) abrange cerca de 110 espécies distribuídas na América Central, América do Sul e México. São morfologicamente caracterizadas por folhas simples, geralmente opostas, menos comum alternas, suboposta ou espiraladas, geralmente triplinervadas, corolas glabras ou glandulares, nunca pilosas, amarelas, menos comum brancas ou avermelhadas e anteras amarelas (PRUSKI & URBATSCH, 1988).

3.1.2 Usos populares

Algumas espécies do gênero são conhecidas pelo nome de erva-de-lagarto como *Calea cymosa* Less., *C. pinnatifida* Less., *C. reticulata* Gardn. e *Calea uniflora* Less. (PIO CORRÊA, 1978). A espécie *Calea serrata*, é nativa no sul do Brasil, e é encontrada com o nome popular de quebra-tudo (Vendruscolo & Mentz, 2006). *Calea pinnatifida* (R.Br.) Less. também conhecida como aruca, guaçatonga, jasmim-do-mato, mata-paca, pau-de-lagarto, habita o Brasil desde o Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul. Partes aéreas são utilizadas como amebicida e também para combater problemas estomacais e para tratamento de cortes e hematomas (MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000).

Dentre os usos populares descritos para outras espécies do gênero *Calea* está o uso no tratamento de úlceras da espécie *Calea urticifolia* em El Salvador (CASTILLO et al., 1981). Já a espécie *Calea glomerata* é uma das plantas mais utilizadas na medicina tradicional na Colômbia para o tratamento da hipertensão (GUERRERO et al., 2002).

As partes aéreas de *Calea serrata* Less. são utilizadas nos casos de dores de barriga, afecções do estômago (gastrites e má digestão) e do fígado e contra úlceras (VENDRUSCOLO; SIMÕES; MENTZ, 2005).

3.1.3 Constituintes químicos

Uma das espécies mais estudadas é a *Calea platylepis* Sch.Bip.ex Baker, para a qual foram descritas substâncias como os flavonóides genkwanina, liquiritigenina e quercetina; o sesquiterpeno (+)-4 α , 7 β -aromadendranediol; os benzofuranos euparina, caleprunina A, caleprunina B e euparona (figura 4), duas saponinas esteroidais o glicopiranosídeo de estigmasterol, e glicopiranosídeo de β -sitosterol de β -sitosterol; e *p*-hidroxiacetofenona (NASCIMENTO et al., 2002).

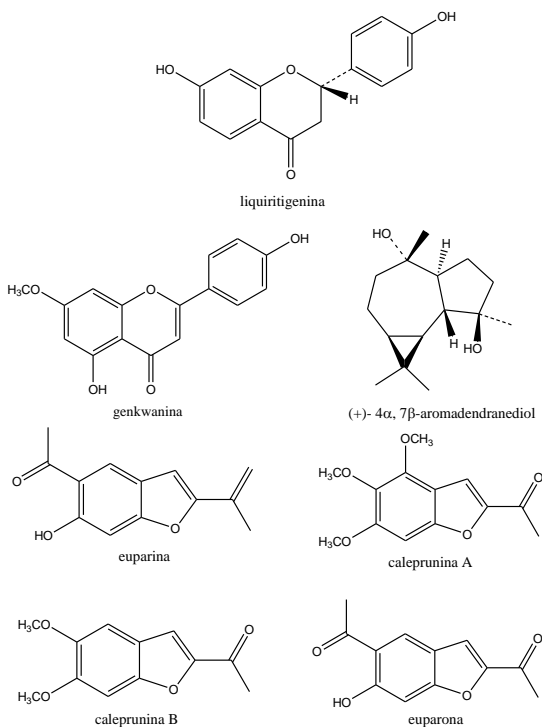


Figura 4: Substâncias relatadas para a espécie *Calea platylepis* Sch.Bip.ex Baker

Das partes aéreas de *Calea clauseniana* foi isolado o novo flavonóide 5-deoxi-flavona glicosilado 7-O-(α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosil-3',4',7'-trihidroxi)flavona (figura 5) (NASCIMENTO et al., 2007).

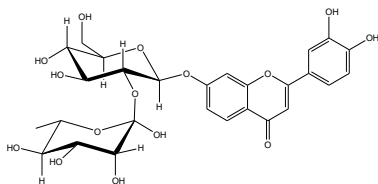


Figura 5: 7-O-(α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2))- β -D-glicopiranosil-3',4',7'-trihidroxi-flavona, substância relatada para a espécie *Calea clauseniana*.

Para a espécie *Calea urticifolia*, foi relatada a presença das lactonas sesquiterpênicas do tipo germacranolídeo juanislamina, 2,3 epóxi-juanislamina (CASTILLO et al., 1981), calealactona A (figura 6), B e C (YAMADA et al., 2004; FERREIRA et al., 1980).

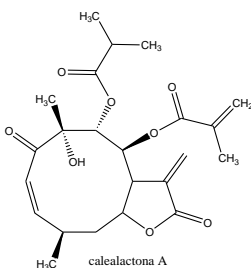


Figura 6: Lactona sesquiterpênica do tipo germacranolídeo relatada para a espécie *Calea urticifolia*.

O estudo fitoquímico da espécie *Calea serrata*, espécie endêmica no sul do Brasil resultou na descoberta de dois cromenos, o eupatoriocromeno e precoceno (figura 7) (STEINBECK et al., 1997).

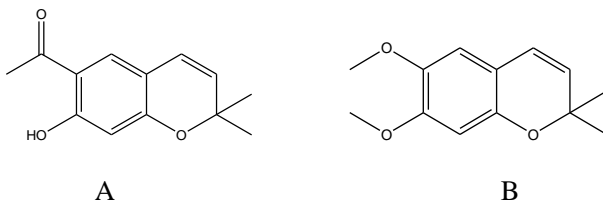


Figura 7: (A) Eupatoriocromeno e (B) precoceno de *Calea serrata*.

Da espécie *C. nelsonii* foram isolados diferentes derivados do timol (MARTÍNEZ et al., 1987; MALDONADO et al., 1992), enquanto que da *C. zacatechichi* foram isoladas uma flavonas e germacronolídeos (MARTÍNEZ et al., 1987; FERREIRA et al., 1980).

Das raízes de *Calea hispida* foram descritos monoterpenos derivados do timol (figura 8), derivados de sesquiterpenos do tipo eudesmano (figura 8) e cromenos, enquanto que as partes aéreas forneceram germacreno D, cariofileno, α -humuleno, biciclogermacreno, heliangolídeos e derivados de farnesol (figura 8) (BOHLMANN et al., 1982).

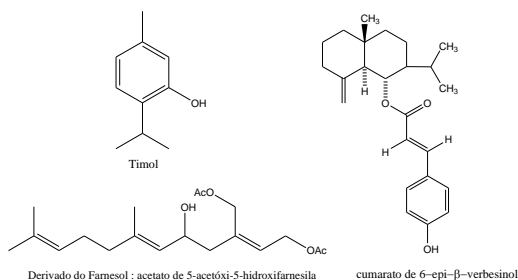


Figura 8: Substâncias descritas para *Calea hispida*.

Das espécies *Calea berteriana* DC. (Venezuela) foram isolados calebertina e o derivado 1,4 dioxano caleteucrina e da espécie *Calea prunifolia* Krunth (Costa Rica) foram isolados derivados de benzofuranos caleprunina A e B (OBER et al., 1985).

Hidroperóxidos derivados do costol e hidroperóxido de 8 β , 12-eudesmanolídeo (figura 9) foram isolados da espécie *Calea prunifolia* (CASTEEL, 1999).

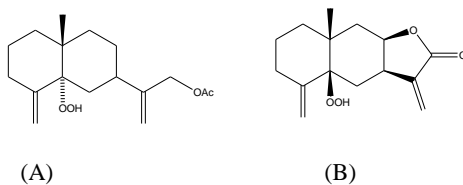


Figura 9: (A) Hidroperóxido derivado do costol e (B) hidroperóxido de 8 β , 12-eudesmanolídeo

Da espécie *Calea trichomata* foram isoladas lactonas sesquiterpênicas dos tipos trichomatolídeos, eudesmanolídeos e heliangolídeos (OBER et al., 1984).

3.1.4 Atividades biológicas descritas

Apesar do número elevado de substâncias químicas relatadas para as espécies desse gênero, são poucos os trabalhos relacionados com atividade biológica. Dentre os trabalhos encontrados está a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos diclorometano das folhas de *Calea platylepis* Sch.Bip.ex Baker e suas substâncias isoladas ((+)-4 α , 7 β -aromadendranediol, euparina, caleprunina B e euparona). Essas substâncias apresentaram atividade antimicrobiana no modelo de difusão em disco, dentre os microorganismos testados estavam *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. A concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias isoladas testadas foi de 500 μ g/mL (NASCIMENTO et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2002). Outra atividade relatada é ação inseticida do extrato hexano das partes aéreas de *Calea serrata*, a atividade acaricida foi visualizada contra larvas e ovos de *Boophilus microplus* e larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (RIBEIRO et al., 2008).

Para a espécie *Calea urticifolia* foi realizado o ensaio de citotoxicidade com o método de MTT (brometo de 3-tiazolil-[4,5-dimetil-tiazol-2il]-2,5-di-fenil-tetrazólio) utilizando células U937, as lactonas sesquiterpênicas do tipo germacronolídeos isoladas das folhas de *Calea urticifolia*. Calealactona C e 2,3-epoxijuanislamina apresentaram toxicidade maior que o controle positivo (partenolídeo) frente às células testadas (YAMADA et al., 2004).

3.2 Gênero *Banara* Aubl.

3.2.1 Dados botânicos

O gênero *Banara* Aubl., descrito em 1775 por Aublet, abrange cerca de 64 espécies distribuídas principalmente na América do Sul. *Banara parviflora* (A. Gray) Benth. foi primeiramente descrita por Asa Gray (1854) com o nome *Khulia parviflora* A. Gray, sendo encontrada em montanhas próximas ao Rio de Janeiro e em 1861 inserida no gênero *Banara* por George Benthham. A espécie *B. parviflora* é conhecida

popularmente no Rio Grande do Sul como farinha seca, sendo nativa do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Sul (SOBRAL et al., 2006).

O gênero *Banara* foi classificado inicialmente como pertencente à família Flacourtiaceae por Klein e Sleumer (1984) tribo Prockieae, posteriormente foi inserido na família Salicaceae, em 2002, com base em estudos morfológicos e moleculares (CHASE et al., 2002; THADEO, 2007; SOBRAL, 2006).

O nome Salicaceae, tem prioridade de uso sobre Flacourtiaceae, de acordo com as regras da nomenclatura botânica e deve ser utilizado em detrimento de Flacourtiaceae (GREUTER et al. 2000; SOBRAL et al., 2006).

A família Salicaceae possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 50 gêneros e 1000 espécies. Do ponto de vista etnobotânico, merece destaque o uso medicinal dos gêneros *Casearia* e *Salix*, que juntamente com o gênero *Populus*, apresentam também utilização como árvores ornamentais. A maioria dos gêneros de Salicaceae que ocorrem no Brasil é formada por poucas espécies e possuem distribuição restrita, à exceção de *Casearia* e *Xylosma* e, em menor escala *Banara*, *Ryania*, *Prockia* e *Laetia* (SOUZA E LORENZI, 2005)

3.2.2 Usos populares

A espécie *Banara guaianensis* Aubl. é utilizada para tratamento de malária em combinação com outras espécies na medicina tradicional da Guiana Francesa (VIGNERON et al., 2005).

3.2.3 Constituintes químicos e atividades biológicas descritas

Através de busca em bases de dados de uso corrente sobre química de produtos naturais não foi encontrado nenhuma publicação sobre a composição química tanto para a espécie *Banara parviflora* (A. Gray) Benth. quanto para as demais espécies do gênero *Banara* Aubl. Contudo, há um relato de ensaio *in vitro* em cultura radiométrica para verificar inibição de *Mycobacterium tuberculosis* realizado com o extrato diclorometano de ramos da espécie *Banara nitida* Spruce ex Benth., apresentando uma inibição de 56% em concentração de 50 µg/mL, por ser uma inibição não considerada forte, não foi realizada a concentração inibitória mínima (CIM), a espécie *Banara arguta* Briquet

(bark) apresentou inibição menor a 50% nessa mesma concentração (GRAHAM et al., 2003).

3.3 Gênero *Verbesina* L.

3.3.1 Dados botânicos

Espécies do gênero *Verbesina* L. pertencem à família Asteraceae, que constitui a maior família das dicotiledôneas, incluindo cerca de 1500 gêneros e mais de 23000 espécies, representando cerca de 10% de toda a flora existente. A família é subdividida em três subfamílias e 17 tribos, que diferem em morfologia, química, citologia e sequência de DNA. O gênero *Verbesina* L. está classificado na tribo Heliantheae, subtribo Ecliptinae apresentando grande importância como promotora de crescimento vegetal e germinação. Adicionalmente, muitas espécies têm demonstrado atividades antibacteriana, fungicida, antiviral e antitumoral (BRUNO-COLMENAREZ, 2010). *Verbesina subcordata* DC. conhecida como chirca é encontrada em campos da América do Sul: Argentina, Paraguai, Bolívia, Uruguai e Brasil (GALVANI et al., 2003).

3.3.2 Usos populares

Para a espécie *Verbesina crocata* (Cav.) Less é referido o uso na medicina tradicional mexicana para mulheres em trabalho de parto sob forma de banhos e uso tópico como tratamento de dores de garganta, queimaduras e feridas (CANALES et al., 2005).

3.3.3 Constituintes químicos e atividades biológicas

Dentre as substâncias características do gênero estão os derivados de eudesmano, sesquiterpenos esterificados frequentemente como cinamatos ou cumaratos. Os primeiros a serem isolados foram os cumaratos de α -e β -verbesinol. Das raízes da *Verbesina subcordata* coletadas no Paraguai, foram isolados diversos compostos sesquiterpênicos, dentre eles, derivados do germacradieno, e diversos cinamatos derivados de eudesmano como os derivados do verbesinol: cinamato de 5-hidróxi-2-isopropil-4a-metil-8metilen-decaidronaftalen-1-ila (SV1b) (figura 10) e seus isômeros, derivados 4 α -hidróxi, o epímero 1,4 α -diidróxi, o derivado hidroperóxido e os compostos

cetônico e o diol. A espécie *Verbesina persicifolia* DC utilizada no México, apresentou como constituintes químicos principais derivados do eudesmano, como o cinamato de oplodiol, 6 β -hidróxi-eudesm-3-eno e cinamato de 5-hidróxi-2-isopropil-4a-metil-8-metilen-decaidronaftalen-1-ila (SV1b) (figura 10) (JAKUPOVIC et al., 1986).

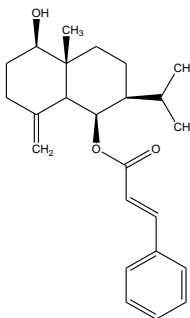


Figura 10: Cinamato de 5-hidróxi-2-isopropil-4a-metil-8-metilen-decaidronaftalen-1-ila (SV1b)

Da *Verbesina sphaerocephala* Asa Gray, coletada no México, foram isoladas lactonas sesquiterpênicas com esqueleto amorfano (figura) do tipo γ -lactol, como o verocefol (figura 11) (SALMÓN et al., 1985).

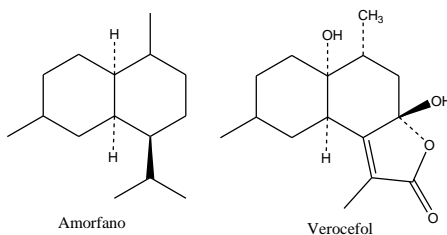


Figura 11: Estruturas do amorfano e do verocefol

Verbesina virginica, uma das dezoito espécies do gênero *Verbesina* encontradas na América do Norte, foi estudada quimicamente e dela foram isolados os seguintes sesquiterpenos derivados de eudesmano: verbesindiol (cumarato de 6 β -diidróxi-eudesmano) (HERZ

et al., 1982) e cumarato de α e β - verbesinol (BOHLMANN & ZDERO, 1979) e as saponinas triterpênicas: verbesinoides A-F (XU et al., 2009).

Dentre algumas espécies que estão sendo estudadas biologicamente, destaca-se a atividade hipotensora das substâncias 1-(3,4-dimetoxicinamoil) amino-4-(3-metilbut-2-enil)guanidinobutano e caracasandiamida de *Verbesina caracasana*, espécie encontrada na Venezuela, para a qual foi descrita a atividade hipotensora em ensaio em ratos por via intravenosa com doses de 50- 6400 $\mu\text{g/Kg}$ (CARMIGNANI et al., 2001; MONACHE et al., 1996).

A espécie *V. enceloides*, planta nativa da América do Norte, conhecida por apresentar atividade tóxica, causando morte em bovinos e ovinos, apresenta como princípio tóxico a guanidina galegina (3-metil-2-butenil-guanidina) (AMARO-LUIS et al., 2002). O teste de toxicidade dessa substância foi realizado em fêmeas de camundongos administrados por via intraperitoneal (OELRICHS et al., 1985).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *Material vegetal*

As partes aéreas de *Calea phyllolepis* Baker (figura 12) e *Verbesina subcordata* DC. foram coletadas em fevereiro de 2008 pelo Prof. Dr. Sérgio Bordignon. As partes aéreas de *B. parviflora* foram coletadas no dia 22/01/2009 no Município de Taquarí no Rio Grande do sul e também identificadas pelo botânico Professor Sérgio A. L. Bordignon.

O material vegetal coletado foi rasurado fresco para a realização dos extratos com solventes orgânicos para a realização da análise química.



Figura 12: Foto da espécie *C. phyllolepis* no município de Taquari. Autor: Sérgio A. L. Bordignon.

4.2 *Procedimentos gerais*

4.1.1 Cromatografia em camada delgada

Para os procedimentos cromatográficos foram utilizados solventes orgânicos de pureza P.A. de procedências variadas como Merck®, Nuclear®, Vetec®, água (destilada em laboratório). Foram utilizadas as cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 da Merck® F256 e Macherey-Nagel® e placas de vidro para cromatografia preparativa de sílica gel 60 da Merck®.

A detecção dos compostos foi através de observação sob lâmpada de ultravioleta de 254 nm e 366 nm ou através da utilização de agentes cromogênicos como o reagente de Huber e Fröhlike (1972) para detecção de peróxidos, o reagente Natural A (NP) para detecção de flavonóides e ácidos fenólicos, reagente de Dragendorff para detecção de alcaloides e anisaldeído-sulfúrico para detecção de terpenoides (WAGNER & BLADT, 1996).

4.1.2 Cromatografia em coluna

As resinas utilizadas como fase estacionária das colunas cromatográficas foram: sílica gel 60 da marca Merck® com as granulometrias de 0,04-0,063 mm; 0,063-0,2 mm e sílica Gel 60G para placa preparativa (5 µm – 40 µm) Vetec®, gel de permeação molecular Sephadex LH-20 de procedência GE Healthcare®, Sílica Gel 60 RP-18 da EMD® (230-400 Mesh) e carvão ativo em pó P.A. Nuclear®.

4.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

Para uso nas análises por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) foram utilizados metanol e acetonitrila grau HPLC de procedência da MTedia® e água Milli-Q (Millipore®). A coluna utilizada foi coluna preparativa Shim-pack ODS 10 mm, 250 mm x 21,2 mm e membranas (Millipore®) de 0,45 µm para purificação da fase móvel e das amostras.

4.1.4 Análise Instrumental

Para a elucidação estrutural das substâncias isoladas, foram utilizados métodos espectroscópicos como a ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C), espectroscopia no infravermelho e no ultravioleta além de Espectrometria de massas.

Os equipamentos utilizados foram:

a) Espectroscopia de RMN: Equipamento Bruker AM 500 (500 e 125 MHz para RMN de ^1H e de ^{13}C respectivamente) e Varian AS-400 NMR (400 and 100 MHz para RMN de ^1H e de ^{13}C respectivamente).

- b) Infravermelho: Equipamento IR Prestige-21 FTIR-8400 Shimadzu
- c) Ultravioleta: Espectrômetro Lambda 10 UV/Vis PerkinElmer
- d) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência: Shimadzu SCL-10A bombas do modelo LC-10AD e detector ultravioleta SPD-10AV
- e) Massas: Espectrômetro Bruker MicrOTOF-Q II

4.3 Preparação dos extratos

As folhas frescas foram separadas das inflorescências e dos ramos para *Verbesina subcordata* DC. e somente dos ramos para *C. phyllolepis* e *B. parviflora*. As folhas e ramos, depois de rasurados com uma tesoura, foram submetidos separadamente à extração com o solvente orgânico diclorometano por três dias e com etanol 96° por sete dias. Os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório com temperatura inferior a 40°C, resultando em extratos diclorometano e etanólico de folhas e ramos de *C. phyllolepis*, *B. parviflora* e extrato diclorometano e etanólico de folhas de *V. subcordata*. O rendimento dos extratos foi avaliado com base na quantidade de extrato para a quantidade de planta seca.

Extrato diclorometano de *B. parviflora* EDB: 400 g de folhas para 2 L de CH₂Cl₂

Extrato etanólico de *B. parviflora* EEB: 400 g de folhas para 2 L de etanol

Extrato diclorometano de *C. phyllolepis* EDC: 500 g de ramos para 5 L de CH₂Cl₂

Extrato diclorometano de *V. subcordata* EDV: 200 g de folhas para 2 L de CH₂Cl₂

Extrato etanólico de *V. subcordata* EEV: 200 g de folhas para 2 L de etanol

4.4 *Calea phyllolepis* Baker

4.4.1 Isolamento, purificação e identificação da substância CA1 e CA1acetilada

4.4.1.1 Fracionamento sobre coluna tipo *flash*: Coluna 1CP

O extrato diclorometano dos ramos de *Calea phyllolepis*, 7 g em forma de pó, foi submetido a fracionamento por coluna sob vácuo

Coluna: funil de vidro sinterizado com granulometria G4

d = 7,5 cm h = 7 cm de altura

Fase estacionária: 45 g de sílica gel 60 G para placa preparativa (5 µm – 40 µm)

Eluente: gradiente crescente de polaridade utilizando hexano, acetato de etila e metanol (100% Hexano, 90 Hexano:10 acetato de etila, 80 Hexano:20 acetato de etila, 70 Hexano:30 acetato de etila, 60 Hexano:40 acetato de etila, 50 Hexano:50 acetato de etila e 50 acetato de etila: 50 metanol)

As substâncias retidas na coluna foram eluídas com uma mistura de acetato de etila e metanol. Cada sistema de solvente de 200 mL é passado no funil e são coletados separadamente em frascos, obtendo-se 7 frações (Figura 13).

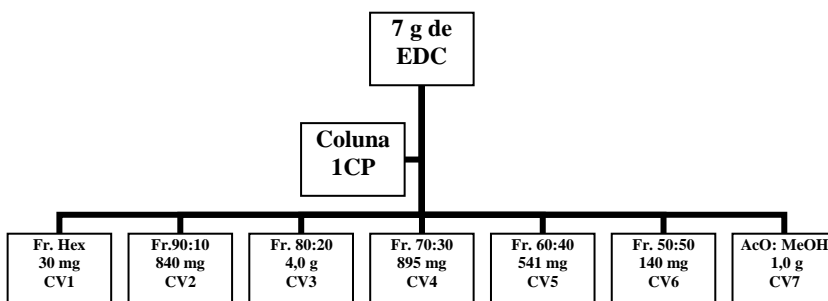


Figura 13: Esquema de fracionamento do extrato diclorometano dos ramos de *C. phyllolepis*

4.4.1.2 Fracionamento em coluna de carvão ativo:
Coluna 2CP

As frações CV2 e CV3 foram reunidas para a realização da coluna de purificação com carvão ativo para a retirada da clorofila e carotenóides, foram aplicados 4,5 g da misturas das frações.

Coluna: funil de vidro sinterizado com granulometria G4

$d = 7,5 \text{ cm}$ $h = 7 \text{ cm de altura}$

Fase estacionária: 10 g de sílica gel 60 G para
placa preparativa: 30 g carvão ativo

Eluente: metanol (100%);

metanol: acetonitrila (50:50, V/V)

tolueno (100%)

Três frações de 200 mL foram obtidas, 1,75 g da fração metanol (CP1), 410 mg da fração metanol: acetonitrila (CP2) e a fração tolueno (2,1 g) (CP3) com intuito de retirar os componentes mais fortemente adsorvidos no carvão ativo e na sílica.

4.4.1.3 Fracionamento sobre coluna de Sephadex LH-20: Coluna 3CP

Com as frações CP1 e CP2 foram realizadas colunas Sephadex LH-20 aplicando 100 mg para isolamento da substância CA1 em cada coluna.

Coluna: coluna de vidro

$d = 2,5 \text{ cm}$ $h = 36 \text{ cm de altura}$

Fase estacionária: 25 g de gel de permeação Sephadex-LH20

Eluente: metanol

Reunindo as frações obtidas através desses procedimentos, resultou em 3 mg da substância CA1. A substância foi analisada por espectroscopia de RMN- ^1H , ultravioleta e infravermelho.

4.4.1.4 Acetilação da fração CP1

Em três tubos de ensaio foram distribuídos 400 mg das frações CP1 e foram submetidos à acetilação com 1,5 mL de anidrido acético e 0,5 mL de piridina (3:1) em cada tubo. Após três dias foi introduzido nos tubos de ensaio gelo para precipitação do derivado acetilado. O precipitado foi centrifugado e lavado com água gelada para nova centrifugação e separação do sobrenadante, com rendimento de 310 mg da fração CP1ac (78%), resultando na substância CA1acetilada após a purificação em coluna de sílica utilizando como fase móvel Éter de Petróleo: acetato de etila (90:10) resultando em 12 mg da substância isolada CP1ac.

A substância CA1 acetilada foi submetida a métodos espectroscópicos de RMN de ^1H , ^{13}C e de correlações em CDCl_3 , Ultravioleta e Infravermelho, além das análises de espectrometria de Massas.

4.5 *Banara parviflora* (A. Gray) Benth.

4.5.1 Isolamento, purificação e identificação das substâncias B9, B10 E BT2

4.5.1.1 Fracionamento em coluna tipo *flash*: Coluna 1BP

O extrato etanólico das folhas de *B. parviflora* (EEB), 15 g em forma de pó, foi submetido a fracionamento por coluna sob vácuo

Coluna: funil de vidro sinterizado com granulometria G4

d = 7,5 cm h = 7 cm de altura

Fase estacionária: 50 g de sílica gel 60 G para placa preparativa (5 μm – 40 μm)

Eluente: gradiente crescente de polaridade utilizando hexano, acetato de etila e metanol (Hexano, 90 hexano:10 acetato de etila, 80 hexano:20 acetato de etila, 70 hexano:30 acetato de etila, 60 hexano:40 acetato de etila, 50 hexano:50 acetato de etila, 40 hexano:60 acetato de etila, metanol)

Cada sistema de solvente de 200 mL é passado no funil e coletado em frascos.

No final foram obtidas oito frações codificadas como BV1 a BV8, em ordem crescente de polaridade.

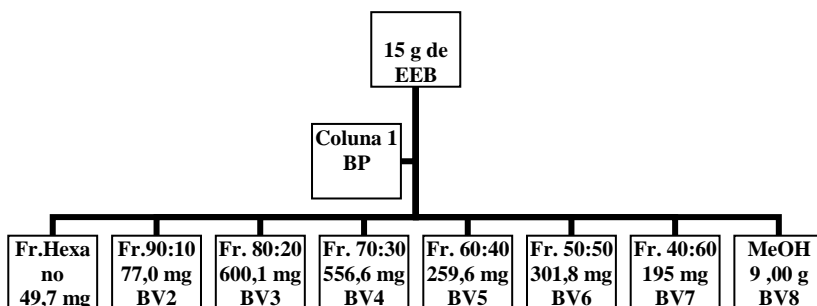


Figura 14: Esquema de fracionamento do extrato diclorometano dos ramos de *B. parviflora*

4.5.1.2 Fracionamento em coluna de carvão ativo: Coluna 2BP

A partir da fração BV8 foi realizada coluna de purificação com carvão ativo para reter a clorofila e carotenóides; foram aplicados 8 g da fração.

Coluna: funil de vidro sinterizado com granulometria G4

d = 7,5 cm

h = 7 cm de altura

Fase estacionária: 10 g de sílica gel 60 G para placa preparativa: 30 g carvão ativo

Eluente: metanol (100%);

metanol: acetonitrila (50:50, V/V)

Duas frações de 200 mL foram obtidas: 234,0 mg da fração metanol (PB1) e 633,9 mg da fração metanol: acetonitrila (PB2).

4.5.1.3 Fracionamento sobre coluna de Sephadex LH-20: Coluna 3BP

Com as frações PB1 e PB2 foram realizadas cinco colunas de Sephadex LH-20 consecutivas com 100 mg cada.

Coluna: coluna de vidro

d = 2,5 cm h = 36 cm de altura

Fase estacionária: 25 g de gel de permeação Sephadex-LH20

Eluente: metanol

Da primeira coluna foram obtidas 75 frações e por cromatografia de camada delgada foram determinadas as frações de interesse. As frações de interesse obtidas da primeira coluna PS20-25 (8,2 mg) e PS60 (4,6 mg), que foram reunidas com frações semelhantes das outras 4 colunas. A fração PS60 foi codificada como a substância isolada B10.

4.5.1.4 Fracionamento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência: Coluna 4BP

A fração PS20-25 (25 mg) foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência preparativa. As soluções foram filtradas por membrana de 0,45 µm antes do uso.

Coluna: Coluna preparativa Shim-pack
ODS

5 mm, 250 mm x 21,2 mm

Fase móvel: acetonitrila: metanol: água
 Milli-Q (30:30:40, V/V/V)

Fluxo 3 mL/min

Deteção 230 nm

Através da separação por CLAE obteve-se a substância B9 (15 mg). A substância foi analisada por espectroscopia de RMN-¹H, ¹³C e correlações (COSY, HSQC/DEPT, HMBC e NOESY), espectrometria de massas, ultravioleta e infravermelho.

4.5.1.5 Purificação das frações BV3 e BV4: Coluna 5BP

Com as frações BV3 e BV4 foi realizada coluna sob vácuo utilizando como resina a sílica de fase reversa. Foi aplicada a amostra dissolvida em metanol (cerca de 150 mg das frações), obtendo frações que foram reunidas pela semelhança cromatográfica.

Coluna: coluna de vidro

d = 2 cm h = 45 cm de altura

Fase estacionária: 50 g de sílica de fase reversa

Eluente: metanol

Foram obtidas 78 frações e após analisadas por cromatografia em camada delgada, foram reunidas por semelhança entre as manchas.

4.5.1.6 Purificação através de Cromatografia em camada delgada preparativa 1

Foi realizada uma cromatografia de camada delgada preparativa com 37 mg da fração 6-8 da coluna 5BP aplicadas com capilar de vidro dissolvidas em diclorometano

Placa cromatográfica: 20 cm X 20 cm

Fase estacionária: sílica gel 60

Eluente: hexano: acetona (75:25, V/V)

As substâncias obtidas foram raspadas e dissolvidas em diclorometano e em seguida em metanol e posteriormente filtradas com papel filtro e funil de vidro. Foram isoladas as substâncias BT 2, BT 3 e BT 8, sendo que foram realizados os espectros de RMN de H^1 das substâncias BT2 e BT8.

4.6 *Verbesina subcordata* DC

4.6.1 Isolamento, purificação da substância SV1

4.6.1.1 Fracionamento em coluna tipo flash: Coluna 1VS

3,5 g de extrato diclorometano das folhas de *V. subcordata* foram submetidos a uma coluna com 150 g de gel de sílica com sistema de solvente hexano: acetato de etila (95:5, V/V).

Coluna: coluna de vidro

d = 2 cm h = 45 cm de altura

Fase estacionária: 150 g de gel de sílica 60 (0,063-0,2 mm)

Eluente: hexano: acetato de etila (95:5, V/V)

As frações de cerca de 50 mL cada foram obtidas, cromatografadas e reunidas de acordo com semelhança entre os perfis.

4.6.1.2 Fracionamento da fração 32-35 em coluna de Sephadex LH-20: Coluna 2VS

Uma coluna de Sephadex LH-20 foi realizada para purificar a fração 32-35 da coluna 1, nesta coluna foi aplicado 150 mg

Coluna: coluna de vidro

d = 2,5 cm

h = 36 cm de altura

Fase estacionária: 25 g de gel de permeação Sephadex-LH20

Eluente: clorofórmio e metanol (50:50, V/V)

Através das frações obtidas dessa coluna obteve-se a substância SV1. A substância foi analisada por espectroscopia de RMN- ^1H , ^{13}C e correlações (COSY, HSQC/DEPT, HMBC e NOESY), espectrometria de massas, ultravioleta e infravermelho.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Investigação química das espécies *Calea phyllolepis* Baker, *Banara parviflora* Benth. e *Verbesina subcordata* DC.

As espécies abordadas neste trabalho, *Calea phyllolepis* Baker, *Banara parviflora* (A. Gray) Benth. e *Verbesina subcordata* DC., foram selecionadas a partir de uma triagem onde todas essas espécies apresentaram resultado positivo para peróxidos (SCHENKEL et al., 2002).

As três espécies foram investigadas buscando isolar ou caracterizar os peróxidos presentes nos extratos. Foi utilizado o extrato diclorometano para fazer a triagem nas três espécies. Na análise cromatográfica dos três extratos (Figura 15) foi possível observar manchas que se apresentam azuis ao revelar com o reagente de Huber e Frölke (1972) o que é característico de substâncias com alto potencial de oxidação como o grupamento peróxido.

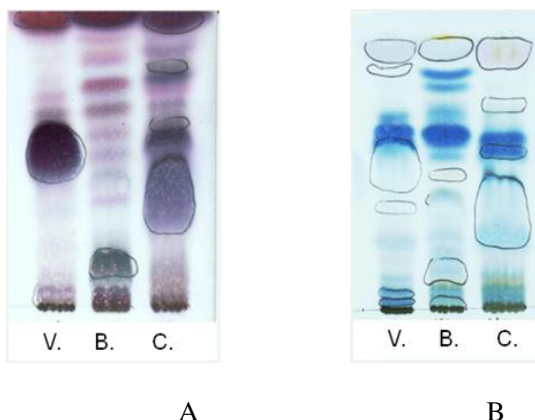


Figura 15: Cromatografia em camada delgada dos Extratos diclorometano das folhas das espécies *V. subcordata* (V), *B. parviflora* (B) e *C. phyllolepis* (C).

Fase móvel: diclorometano. A) Detecção: Reagente anisaldeído-sulfúrico; B) Detecção: Reagente para peróxidos segundo Huber e Frölke.

Nessa revelação os endoperóxidos revelam cerca de 30 minutos após ser borrifado o reagente na placa enquanto que os hidroperóxidos revelam instantaneamente. A artemisinina utilizada como padrão para verificar se a revelação estava ocorrendo de forma adequada, apresentou desenvolvimento de coloração em 25 minutos. Como mostra a figura 15, a análise indica a presença de peróxidos, embora a predominância de substâncias reveladas com anisaldeído-sulfúrico seja evidente. No momento da revelação foi ainda observado que esses se tratam principalmente de hidroperóxidos.

Foram realizadas outras análises cromatográficas comparando extratos diclorometano, etanólico e entre as partes das plantas. O extrato diclorometano dos ramos da espécie *C. phyllolepis* apresentou maior quantidade de peróxidos em seu perfil, enquanto que para a espécie *B. parviflora* os extratos diclorometano e etanólico das folhas e ramos apresentaram o mesmo perfil.

Após a realização de sucessivos procedimentos de separação e purificação, a quantidade obtida de frações contendo peróxido foi insuficiente para análise espectroscópica. Também é provável que algumas das frações obtidas sofreram decomposição.

5.1.1 Investigação química de *Calea phyllolepis* Baker

Para o estudo das partes aéreas da espécie *Calea phyllolepis* Baker foi utilizado o extrato diclorometano dos ramos, tendo em vista a predominância de peróxidos em relação ao extrato das folhas. O extrato foi submetido a sucessivos procedimentos cromatográficos para resultar no isolamento da substância CA1 (3 mg), do qual foi realizada a acetilação. A elucidação estrutural das substâncias em conjunto é descrita a partir do item 5.1.1.3.

5.1.1.1 Rendimento dos extratos

Os extratos das partes aéreas de *Calea phyllolepis*, processados através de extração com diclorometano, apresentaram bons rendimentos, conforme demonstrado na figura 16.

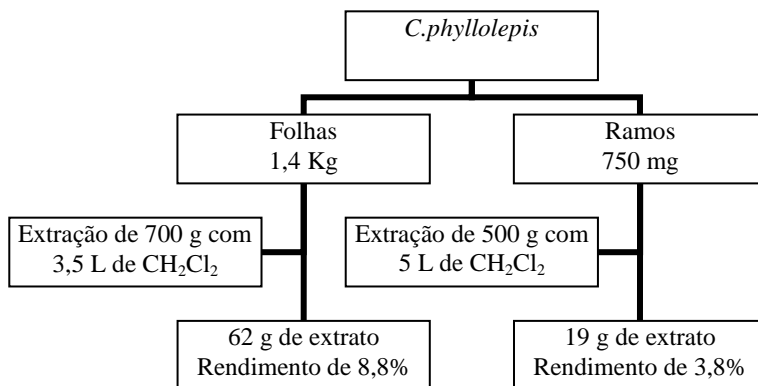


Figura 16: Rendimento dos processos de extração com diclorometano das folhas e ramos de *C. phyllolepis*.

5.1.1.2 Isolamento, purificação e identificação da substância CA1 E CA1acetilada

Os procedimentos utilizados buscando o isolamento de peróxidos conduziram a uma substância principal, com reação negativa para peróxidos e coloração violácea com anisaldeído, substância correspondente a maior mancha, a substância CA1. Dessa substância foram obtidos 3 mg, na forma de pó branco através dos métodos cromatográficos descritos no item 4.4.1 a partir do extrato diclorometano dos ramos de *Calea phyllolepis* Baker.

Para a determinação estrutural, a fração CP1 da coluna de purificação de carvão foi utilizada para realizar a reação de acetilação (figura 17) e através de métodos cromatográficos foi possível o isolamento do derivado acetilado (CA1 acetilada), flocos brancos.

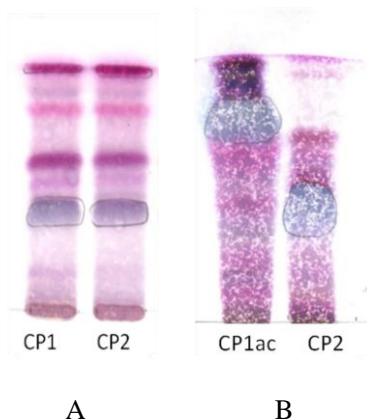


Figura 17: A) Análise cromatográfica das frações da coluna 2BP de *Calea phyllolepis*; B) Análise cromatográfica da fração CP1 acetilada e fração CP1 da coluna 2BP.

Fase móvel: diclorometano, Detecção: anisaldeído-sulfúrico.

5.1.1.3 Elucidação estrutural das substâncias CA1 E CA1 acetilada

A elucidação estrutural da substância obtida foi através do derivado acetilado por apresentar maior quantidade e assim, possibilitando a realização de espectros completos e de maior resolução. A análise espectroscópica da substância CA1 acetilada foi através de espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e de correlação (COSY, HSQC-DEPT 135°, HMBC e NOESY).

O RMN de hidrogênio (Figuras 18 e 19) apresentou dois dubletos com sinais de CH_2 em δ 4,55 e δ 4,75, com constante de acoplamento pequena ($J = 0,85 \text{ Hz}$) referente a acoplamento de hidrogênios geminais característicos de metileno olefínico ligado a carbono tetra-substituído. Dois outros dubletos (δ 7,52; δ 7,1) em região característica de hidrogênio de anel aromático são referentes a quatro hidrogênios (cada sinal sugere dois hidrogênios equivalentes) sugerindo um anel aromático di-substituído na estrutura (Figura 20). Observam-se ainda hidrogênios ligados aos carbonos mais desblindados, como o tripleto em δ 5,18.

Cam1Ac 1H

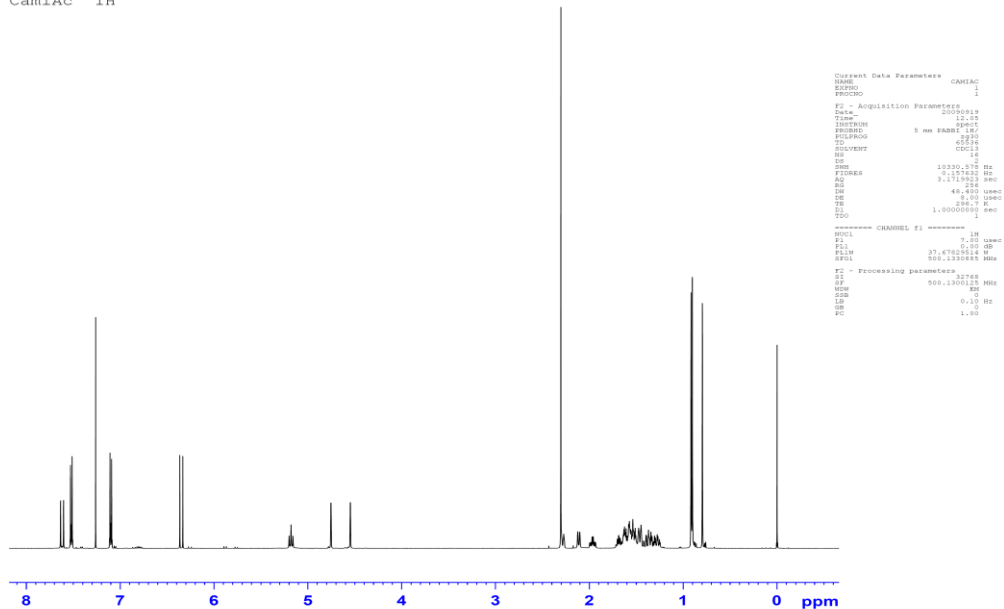


Figura 18: Espectro de RMN de ^1H da substância CA1acetilada em CDCl_3 , 500 MHz.

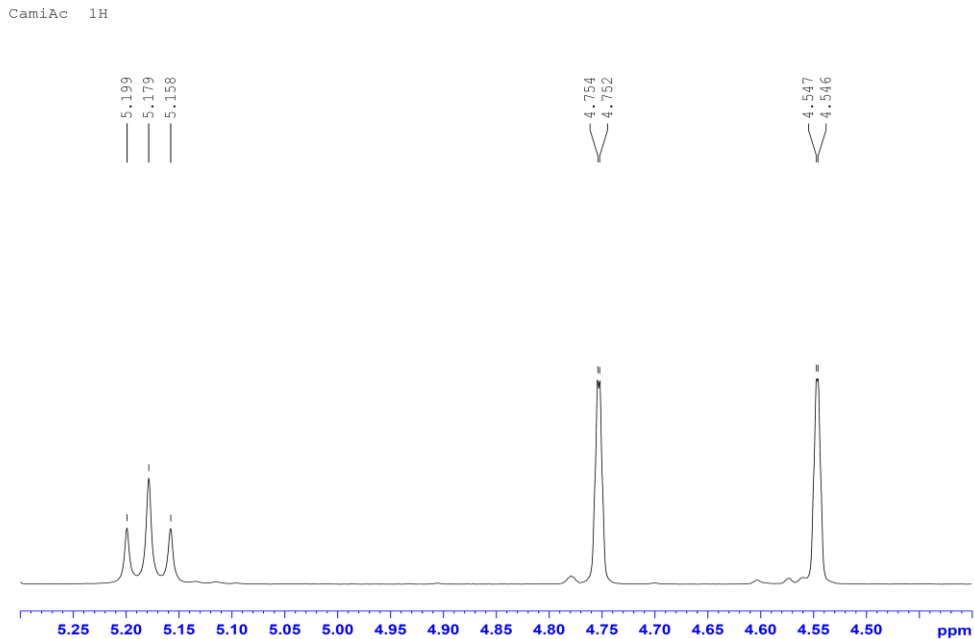


Figura 19: Espectro de RMN de ^1H da substância CA1acetilada em CDCl_3 , ampliado entre δ 4,50 e δ 5,25 (500 MHz).

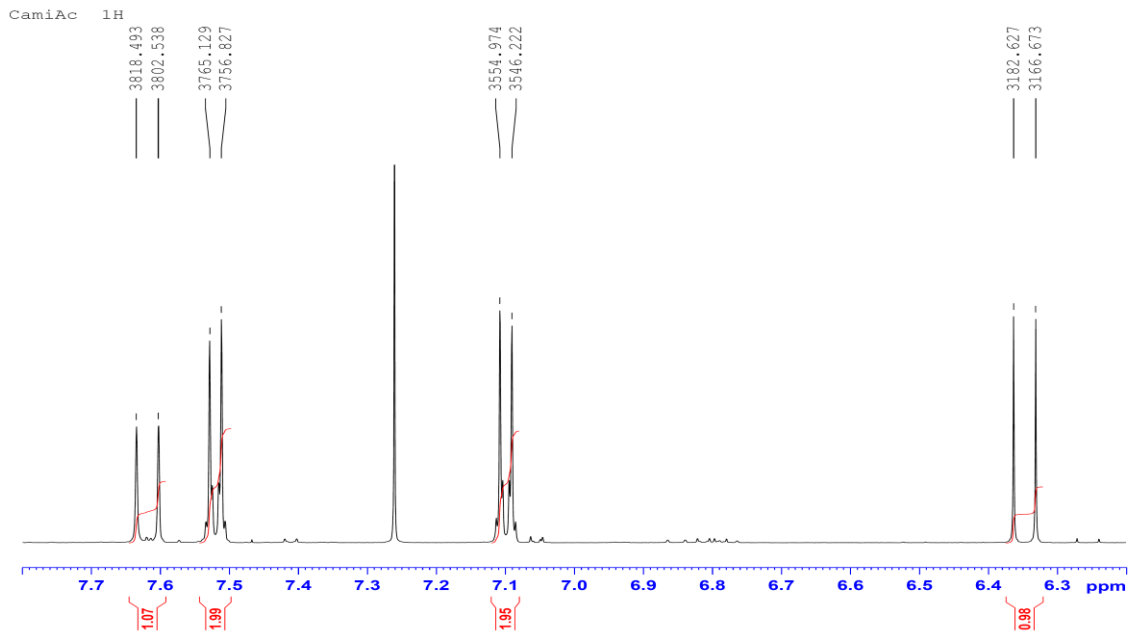


Figura 20: Espectro de RMN de ^1H da substância CA1acetilada em CDCl_3 , ampliado entre δ 6,3 e δ 7,7 (500 MHz).

Os espectros de ^{13}C (figura 21 e 22) e os dados obtidos pelo HSQC - DEPT 135° (figura 23) são apresentados na tabela 1 e foram suficientes para definir as conexões de todos os carbonos ligados a hidrogênio, definindo assim, em conjunto a presença de 4 CH_3 , 6 CH_2 , 10 CH e 6 C . Seis desses sinais de ^{13}C são referentes a um anel aromático (δ_{C} 132,31; 129,16; 121,98; 151,92), dois sinais são de carbonilas (δ_{C} 166,98 e 169,11) e 4 são de dupla ligação (δ_{C} 106,71; 146,26; 143,39 e 118,78).

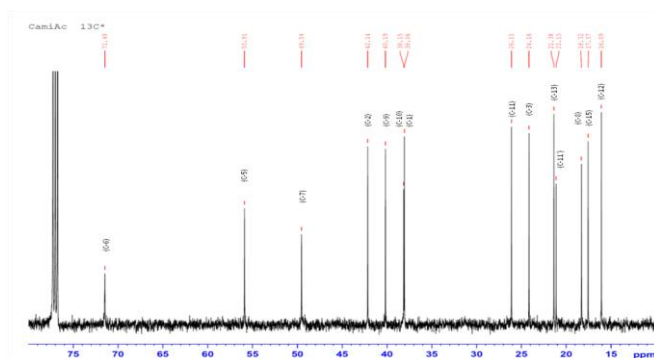


Figura 21: Espectro de RMN de ^{13}C da substância CA1 acetilada em CDCl_3 , ampliado entre $\delta 10$ e $\delta 75$ (125 MHz).

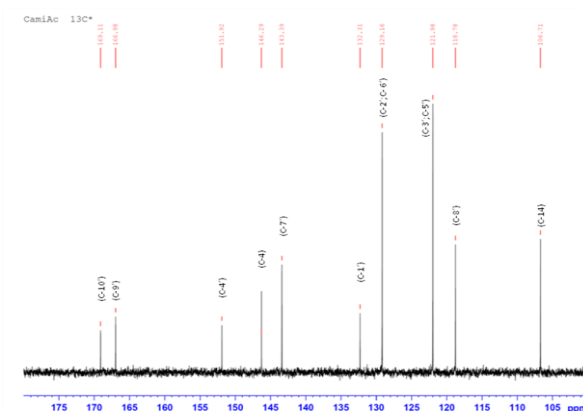


Figura 22: Espectro de RMN de ^{13}C da substância CA1 acetilada em CDCl_3 , ampliado entre $\delta 105$ e $\delta 175$ (125MHz).

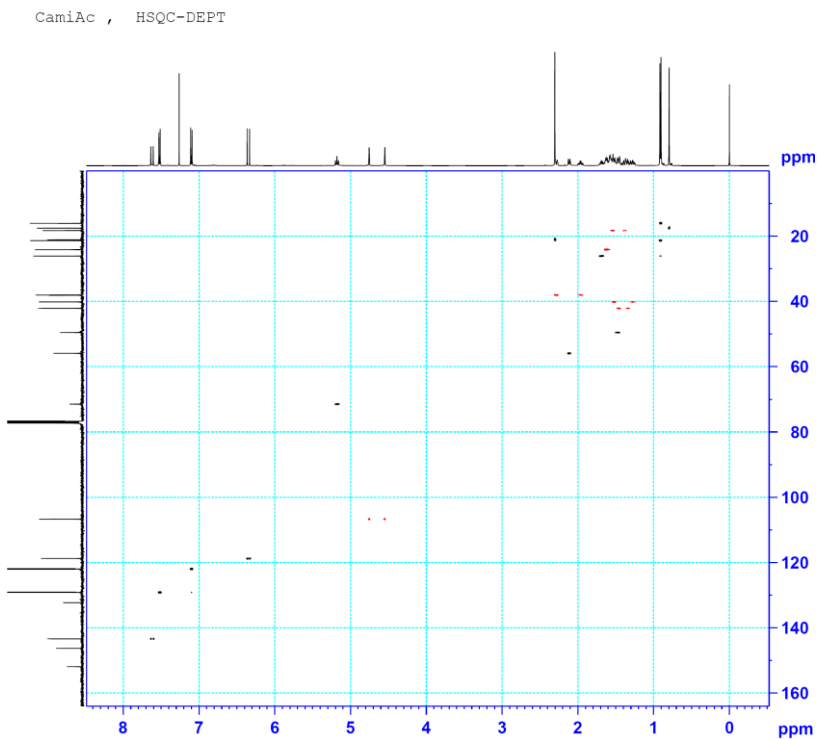


Figura 23: Espectro de correlação HSQC-DEPT da substância CA1 acetilada em CDCl_3 (500 e 125 MHz).

Tabela 1: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância CA1 acetilada obtidos através dos espectos de RMN de ^{13}C , ^1H e HSQC DEPT 135° em CDCl_3 (500 e 125 MHz)

C	CA1acetilado (CDCl_3)	
	^{13}C (125 MHz)	^1H (500 MHz)
1	38,1	1,98;2,29
2	24,1	1,62
3	42,1	1,47;1,35
4	146,3	-
5	55,9	2,11
6	71,5	5,18
7	49,5	1,49
8	18,3	1,38;1,54
9	40,2	1,29;1,52
10	38,2	-
11	26,1	1,68
12	16,1	0,91
13	21,4	0,91
14	106,7	4,75;4,55
15	17,6	0,79
1'	132,3	-
2'; 6'	129,2	7,52
3';5'	122,0	7,10
4'	152,0	-
7'	143,4	7,62
8'	118,8	6,35
9'	167,0	-
10'	169,1	-
11'	21,1	2,30

Os sinais da carbonila em δ 169,1 e de metila em δ 21,1 correlacionadas por HMBC (figura 24) entre si e com o carbono 152,0, pertencente ao anel aromático, indicam o grupamento acetila ligado ao anel aromático da porção cinamato (figura 25). As demais correlações observadas no HMBC e COSY (figura 26) foram determinantes para a determinação das estruturas parciais da substância CA1.

CamiAc HMBC

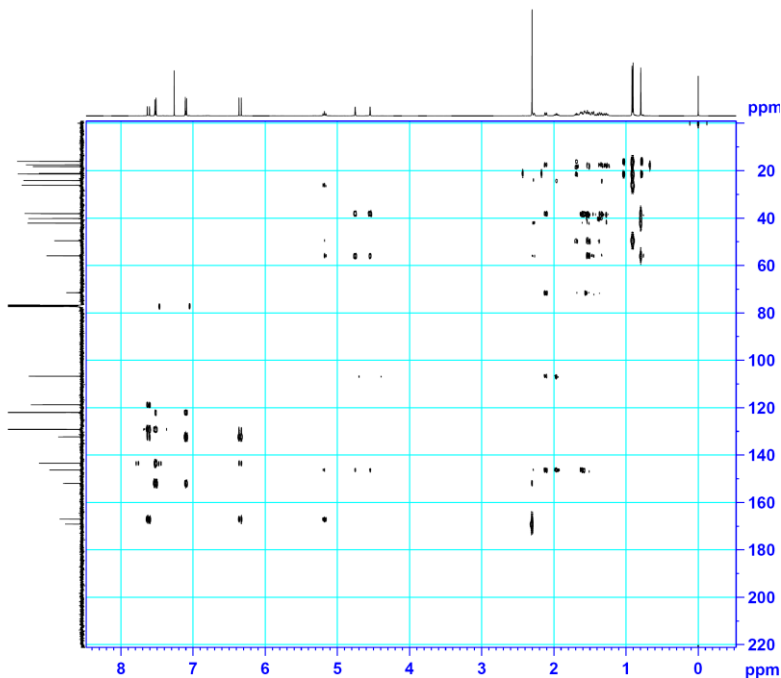


Figura 24: Espectro de correlação HMBC da substância CA1 acetilada em CDCl_3

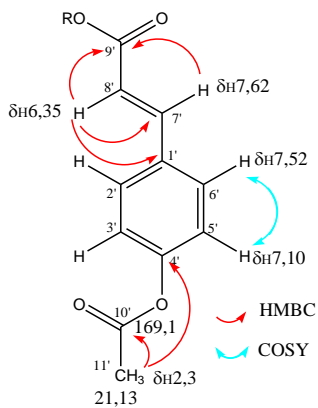


Figura 25: Acoplamentos de HMBC e COSY da porção cinamato da substância CA1 acetilada.

Cam1Ac , COSY

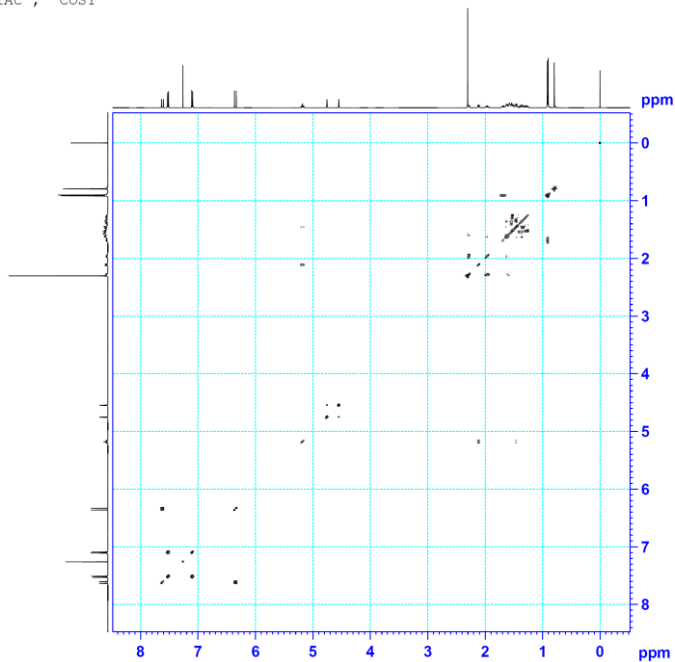


Figura 26: Espectro de COSY da substância CA1 acetilada em CDCl_3

Dessa forma, considerando também a presença do éster do ácido cumárico, restam 15 carbonos, sendo 3 CH₃, 6 CH₂, 4 CH e 2 C, com índice de insaturação três, apresentando uma dupla ligação exocíclica e dois anéis. Além disso, é possível evidenciar a presença de um radical isopropila pela presença de um dubleto com integração para seis hidrogênios com correlação H-H com hidrogênio de CH (δ 1,68) e ainda 5 CH₂ saturados. Esses dados apontam para a estrutura de um sesquiterpeno do tipo eudesmano (figura 27).

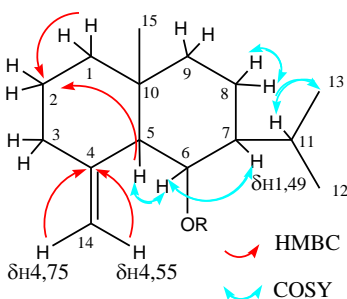
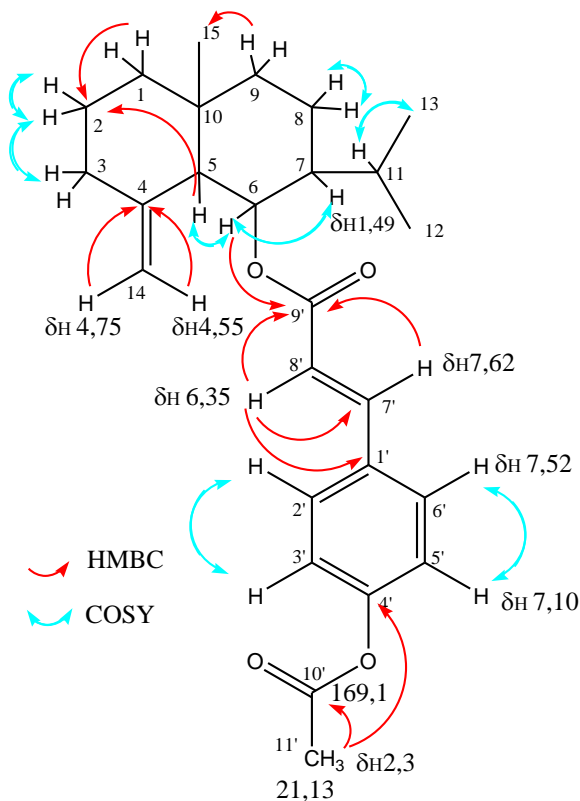


Figura 27: Acoplamentos de HMBC e COSY da porção terpênica da substância CA1acetilada.

A figura 28 mostra algumas das correlações observadas nos espectros de COSY e HMBC que foram determinantes para propor a estrutura.



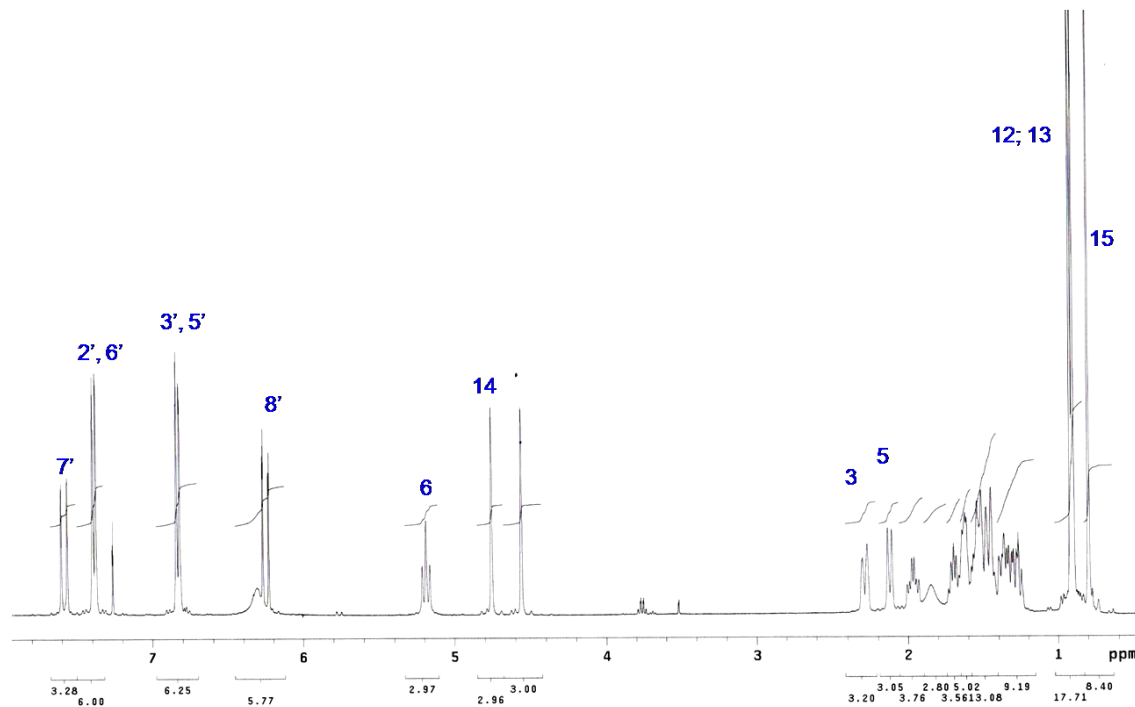


Figura 29: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de CA1 em CDCl_3 .

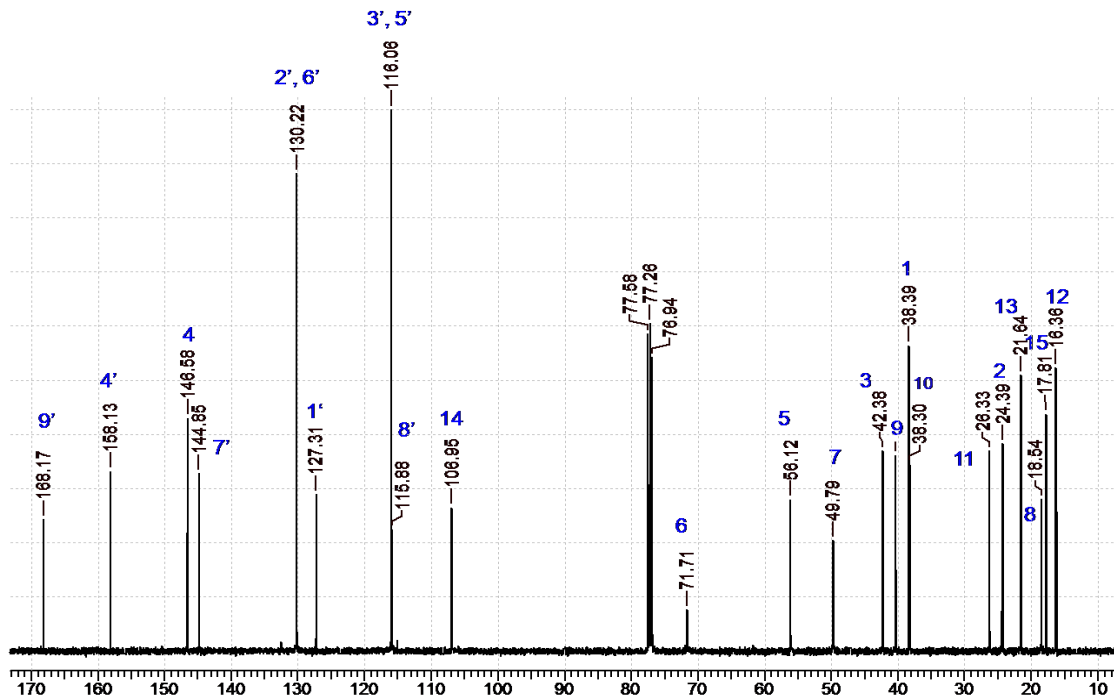


Figura 30: Espectro de RMN de ^{13}C de CA1 em CDCl_3 .

A substância proposta cumarato de 6-epi- β -verbesinol já foi descrita anteriormente de outras espécies do gênero *Calea* (*Calea reticulata* e *Calea hispida*) e ainda de outros gêneros da Família Asteraceae, como as espécies *Melampodium camphoratum*, *Verbesina subcordata* e *Verbesina virginica* L. (BOHLMANN et al., 1982a; BOHLMANN et al., 1982b; CHATURVEDULA et al., 2004; JAKUPOVIC et al., 1987; GARDNER et al., 1961). Na tabela 2 os valores de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância CA1 estão dispostos juntamente com os valores obtidos em estudos da literatura para comparação.

Tabela 2: Comparação dos de RMN de ^{13}C e ^1H da substância CA1 e da literatura

C	CA1 (100 e 400 MHz, CDCl_3)		Bohlmann, 1982 (100 e 400 MHz, CDCl_3)	Chaturvedula, 2004 500 MHz, CDCl_3
	^{13}C	^1H	^1H	^1H
1	38,39	1,96; 2,29		1,95
2	24,4	1,61		1,68
3	42,4	1,34; 1,45		1,52; 1,30
4	146,59	-		
5	56,1	2,12	2,11	2,04
6	71,7	5,2	5,18	5,12
7	49,8	1,48	2,29	1,38
8	18,5	1,54; 1,38		1,56; 1,26
9	40,41	1,52; 1,28		2,29
10	38,3	-		
11	26,3	1,7		1,62
12	16,3	0,91	0,92	0,87
13	21,6	0,91	0,92	0,88
14	106,96	4,56; 4,75	4,36; 4,76	4,59; 4,77
15	17,81	0,79	0,8	0,76
1'	127,32	-		
2'; 6'	130,23	7,4	6,84	6,77
3'; 5'	116,07	6,85	7,39	7,6
4'	158,15	-		
7'	144,9	7,6	7,59	6,78
8'	115,9	6,25	6,29	5,75
9'	168,0	-	-	-

Essa substância e derivados isolados de *Melampodium camphoratum* foram testados como antimalárico em ensaio contra *Plasmodium falciparum* e os resultados foram expressos em valores de

IC₅₀ (µg/mL). As substâncias cumarato de 6-epi-β-verbesinol e seu derivado acetilado não apresentaram atividade por apresentar valores de DC₅₀ > 200 µg/mL DC₅₀ é correspondente a dose requerida para reduzir a decomposição da hemina em 50 %) o resultado é comparado com o fármaco controle quinina que apresenta DC₅₀ = 1,3 µg/mL (CHATURVEDULA et al., 2004).

5.1.2 Investigação química de *Banara parviflora* (A.Gray) Benth.

Para o estudo químico das partes aéreas da espécie *Banara parviflora* (A.Gray) Benth. foi utilizado o extrato etanólico das folhas. O extrato diclorometano, geralmente utilizado na busca de peróxidos, ao ser analisado novamente para início dos processos de isolamento, não apresentava mais substâncias com reação positiva para o reagente para peróxidos de Huber e Frölke, isto é, os peróxidos não puderam mais ser detectados. Por esse motivo, o extrato utilizado foi o etanólico, já que este apresentou maior rendimento. O extrato foi submetido a sucessivos procedimentos cromatográficos para resultar no isolamento das substâncias B9 (15 mg), B10 (4,6 mg), BT2 (2 mg) e BT8 (4 mg). A elucidação estrutural das substâncias é descrita a partir do item 5.5.3, sendo apresentados os espectros.

5.1.2.1 Rendimento dos extratos

As extrações das folhas de *B. parviflora* com etanol e diclorometano apresentaram o seguinte rendimento:

Tabela 3: Rendimento dos extratos de *B. parviflora*.

400 g de Folhas Secas e Moídas	Extrato <i>CH₂Cl₂</i>	Extrato Etanólic o
	12,6 g	16 g
Rendimento*	3,4%	4%

*Percentual em relação aos 400 g de folhas extraídas.

5.1.2.2 Análise cromatográfica, isolamento e purificação das frações

Apesar da ausência de peróxidos no extrato, nas análises cromatográficas foram observadas substâncias com forte extinção de fluorescência, as quais foram investigadas. O extrato etanólico (conforme item 4.5.3) foi então submetido à coluna sob vácuo (coluna 1) para uma separação preliminar. Desta coluna resultaram oito frações codificadas como BV1-BV8 (figura 31).

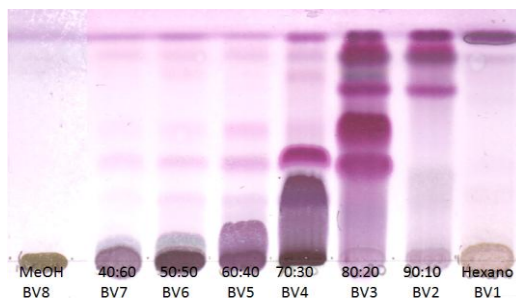


Figura 31: Cromatografia em camada delgada das frações da coluna BP1 (BV1-BV8).

Fase móvel: diclorometano

Deteção: anisaldeído-sulfúrico

Através da investigação cromatográfica das frações obtidas da coluna sob vácuo do extrato bruto etanólico das folhas de *B. parviflora* utilizando colunas de gel de sílica, sílica de fase reversa e de permeação molecular foi possível o isolamento das substâncias B9, B10, BT2 e BT8.

A substância codificada como B9 foi isolada da fração de maior rendimento (BV8) da coluna sob vácuo CB 1 após a realização de uma coluna sobre carvão ativado e sílica gel. A grande quantidade de clorofila existente na fração foi adsorvida pelo carvão, facilitando a separação de outros componentes. Na análise cromatográfica, manchas semelhantes a flavonóides foram observadas após revelação com Reagente Natural e algumas outras com extinção de fluorescência sob a

luz de ultravioleta (256 nm). Foram realizadas colunas de Sephadex LH-20 para separação destes e também de cromatografia líquida de alta eficiência de modo preparativo (figura 32), resultando nos compostos isolados B9 e B10.

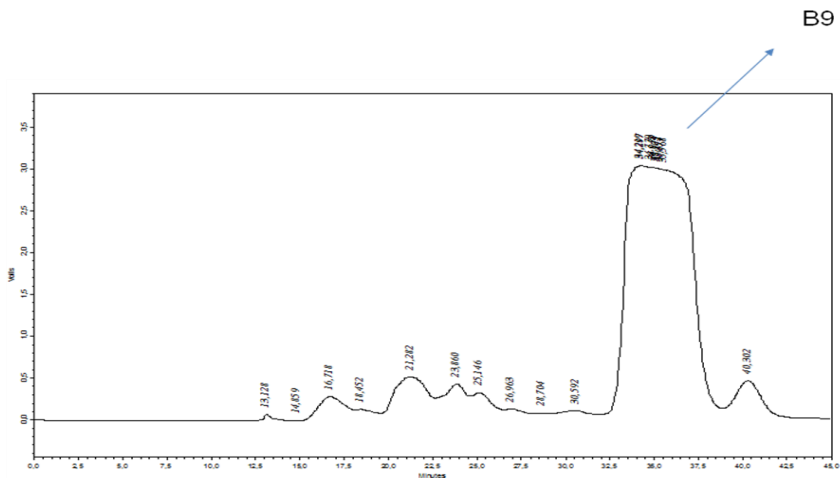


Figura 32: Cromatografia líquida de alta eficiência da substância B9 no modo preparativo.

Fase Móvel: Acetonitrila: MeOH: H₂O Mili-Q (3:3:4, V/V) e fluxo de 3 mL/min

Para a análise por cromatografia de camada delgada das substâncias isoladas foram testados vários reagentes de detecção como Reagente Natural A, Reagente de Dragendorff, Anisaldeído-sulfúrico, e Reagente de Ehrlich. As fases móveis utilizadas foram acetato de etila: H₂O: ácido fórmico (90:5:5, V/V/V) e acetato de etila: H₂O: ácido fórmico (80:10:10, V/V/V) e ainda foram utilizados para comparação, padrões autênticos de flavonóides C-glicosídeos e alcaloides, tendo em vista algumas características mencionadas a seguir.

A substância B9 apresentou mancha com R_f 0,45, com fluorescência branca sob luz ultravioleta em 366 nm e presença de extinção de fluorescência sob luz ultravioleta em 256 nm. Após a revelação com Reagente de Dragendorff a banda apresentou coloração alaranjada (figura 33). Com a utilização dos demais reagentes de

detecção, Reagente de Ehrlich, Reagente Natural A e Ninhidrina e Anisaldeído-sulfúrico não foi visualizada reação de coloração.

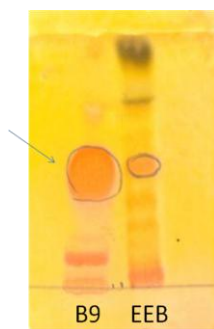


Figura 33: Cromatografia em camada delgada da substância B9 semi-purificada e do extrato etanólico de *B. parviflora*.

Fase móvel: acetato de etila: água: ácido fórmico (90:5:5, V/V/V)

Detecção: Reagente de Dragendorff.

A substância codificada como B10 apresentou sua mancha com Rf 0,35, com fluorescência alaranjada sob luz ultravioleta em 366 nm e extinção de fluorescência sob luz ultravioleta em 256 nm. Após revelação com Reagente Natural A, a mancha adquire uma coloração amarelada ao visível, apresentando alguma similaridade com flavonóides C-glicosídeos (ZUCOLOTTO, 2005). A análise por espectroscopia de ultravioleta (figura 34) com utilização de reagentes de deslocamento, indicou a presença da porção o-diidroxi do anel B sugerindo um núcleo do tipo luteolina. Através de comparação com amostras autênticas disponíveis no laboratório (orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina, swertisina, entre outras) utilizando co-cromatografia em camada delgada e em cromatografia líquida de alta eficiência foi possível confirmar a identidade da substância B10 como orientina, flavona C-glicosilada com núcleo luteolina (figura 35).

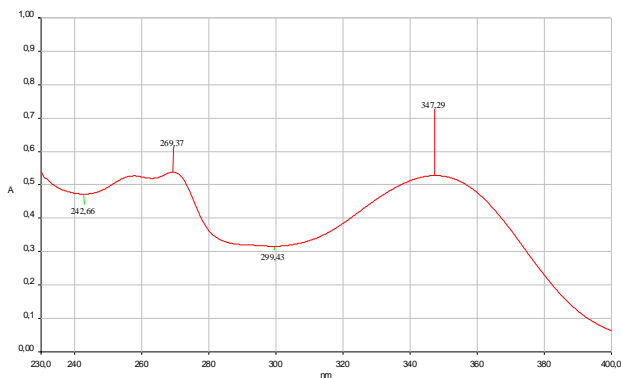


Figura 34: Espectro de ultravioleta da substância B10 (orientina) em metanol.

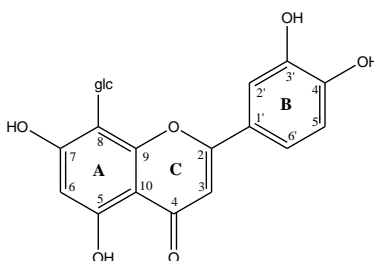


Figura 35: Estrutura do flavonóide C-glicosídeo orientina

Ainda foi realizada a comparação com o extrato etanólico (EEB) para confirmar a presença destes compostos na planta, observando-se principalmente a substância B9 como majoritária no extrato.

Das frações codificadas BV3 e BV4 foram realizadas colunas de fase reversa de onde foram obtidas a substância BT2 e BT8. A substância BT8 foi caracterizada através dos espectros de IV e ^1H RMN como um ácido graxo (dados não apresentados).

5.1.2.3 Elucidação estrutural da substância BT2

Foram obtidos 5 mg da substância BT2 na forma de pó branco, apresentando valor de R_f 0,45 no eluente diclorometano, com ausência de extinção de fluorescência e de fluorescência (luz UV_{256nm} e UV_{366 nm}).

respectivamente). Quando utilizado o revelador anisaldeído-sulfúrico, foi observada mancha de coloração rósea (Figura 36).

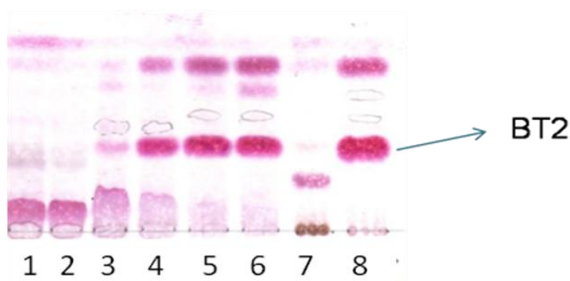


Figura 36: Cromatografia em camada delgada das frações da coluna em fase reversa 5BP

Fase móvel: diclorometano ; Detecção: anisaldeído- sulfúrico

No espectro de RMN de ^1H (figura 37) foi possível visualizar a presença de 4 CH_3 (d) ligadas a CH alifático em região entre δ 0,8 e δ 0,9 e uma metila deslocada na região de δ 1,63, além de um tripleto em δ 5,4 referente ao hidrogênio do CH da olefina e um duplete em δ 4,15 referente ao CH_2 ligado a hidroxila (figura 38).

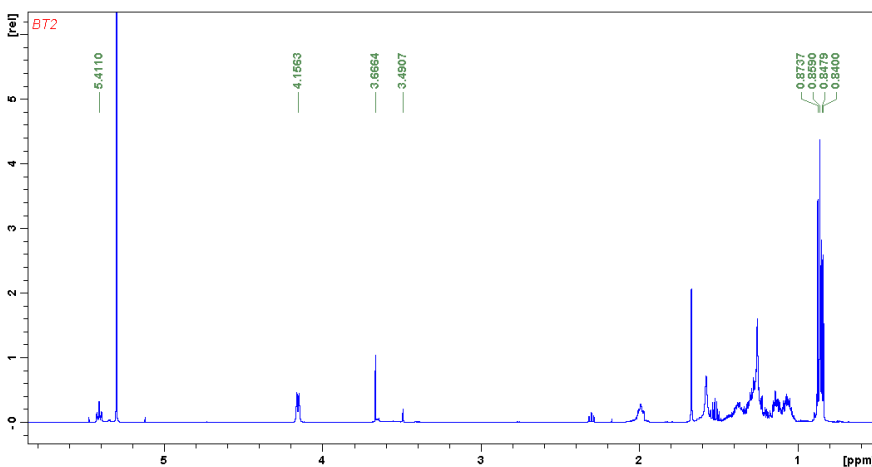


Figura 37: RMN de ^1H da substância BT2 em CDCl_3

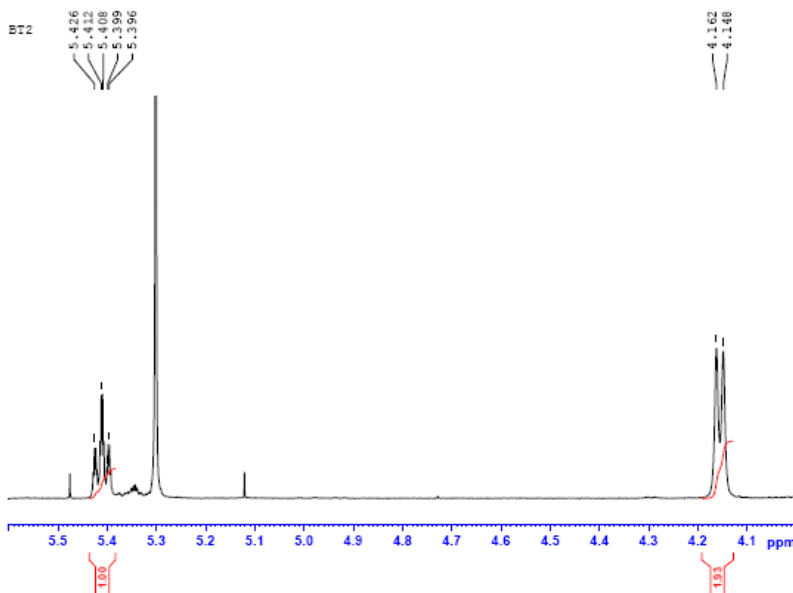


Figura 38: Espectro de RMN de ^1H da substância BT2 em CDCl_3 , ampliação da região entre δ 4,0 e δ 5,6

Através dos espectros de RMN de hidrogênio foi possível determinar a sua identidade como sendo o álcool vinílico 3,7,11,15-tetrametil-hexadec-2-en-1-ol, conhecido como fitol (figura 40), diterpeno bastante comum em produtos naturais e responsável pela formação da cadeia lateral lipofílica da vitamina K_1 e das clorofilas (DEWICK, 2002).

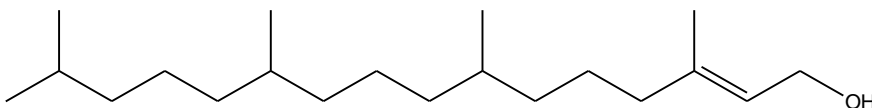


Figura 39: Estrutura do fitol.

5.1.2.4 Elucidação estrutural da substância B9

Foram isoladas 15 mg da substância B9, a qual apresenta aspecto de óleo, viscoso e esbranquiçado e oleoso. Realizada a CCD da referida

substância com o sistema acetato de etila: H_2O : ácido fórmico (90:5:5, V/V/V) foi observada fluorescência branca sob luz ultravioleta em 366 nm e presença de extinção de fluorescência sob luz ultravioleta em 256 nm. Após a revelação com Reagente de Dragendorff, a banda apresentou coloração alaranjada sugerindo tratar-se de substância nitrogenada.

O que foi observado no cromatograma pode ser confirmado no espectro de IV (figura 40) da substância, o qual apresenta uma banda de absorção característica de estiramentos NH ou NH_2 (3410 cm^{-1}) acompanhada de banda em 1546 cm^{-1} . A banda em 1309 cm^{-1} pode ser atribuída a estiramento da ligação C-N. Observa-se também uma banda alargada em 615 cm^{-1} característica de dobramento de N-H fora do plano. Na região entre 1680-1630, característica de carbonilas de amida pode-se observar duas bandas de absorção, uma em 1643 cm^{-1} e outra em 1635 cm^{-1} (SMITH, 1999). A absorção máxima no ultravioleta foi observada em 232 nm utilizando metanol como solvente (figura 41).

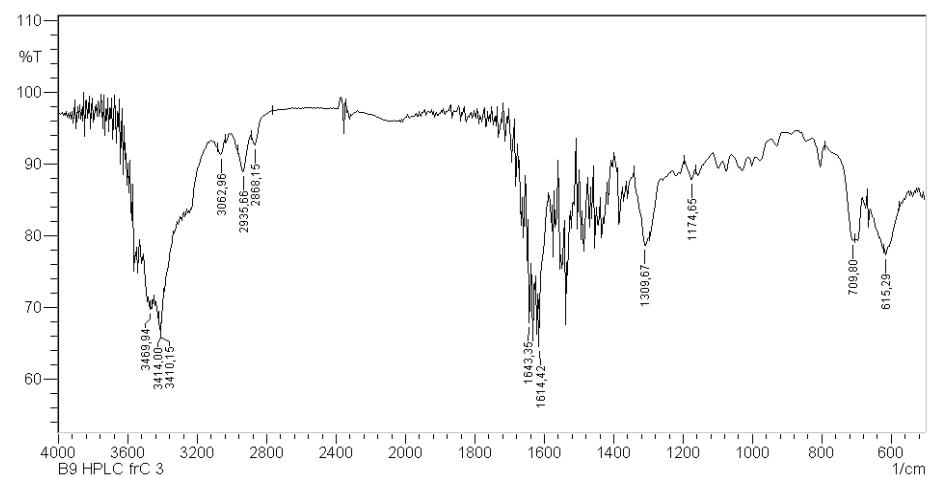


Figura 40: Espectro de infravermelho da substância B9 obtido na forma de pó com KBr através de reflectância difusa.

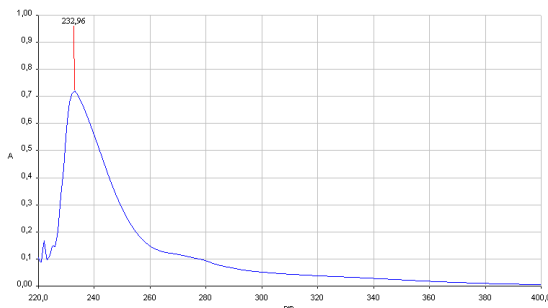


Figura 41: Espectro de ultravioleta da substância B9 em metanol

Através dos espectros de RMN ^1H , ^{13}C e de correlação (COSY, HSQC/DEPT, HMBC e NOESY) foi possível atribuir deslocamentos químicos correspondentes a cada carbono e hidrogênio. Os espectros de correlação possibilitaram observar as ligações entre carbonos e seus respectivos hidrogênios (CH-HSQC), entre hidrogênios vizinhos (HH-COSY), entre hidrogênios e carbonos a longa distância (CH-HMBC) e entre hidrogênios acoplados espacialmente (NOESY).

Os espectros de ^{13}C evidenciam a presença de 23 átomos de carbono, dos quais três carbonos são de carbonilas (δ_{C} 171,8; 168,0 e 167,6), 12 carbonos de anel aromático e 7 carbonos de CH_2 (Figuras 42 e 43). Através do espectro de correlação de HSQC-DEPT 135° , além de atribuir as conexões entre carbonos e hidrogênios (figura 44), foi possível distinguir os sinais correspondentes às metilas e aos carbonos terciários (CH) dos sinais de carbonos secundários (CH_2).

B9 # //CDCl3// , (Dr.Palermo), 13C* 20/06/09.

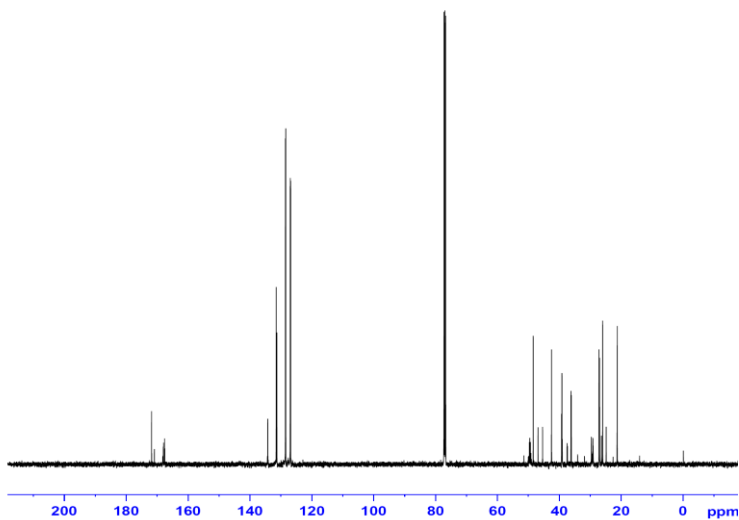


Figura 42: Espectro de RMN ^{13}C da substância B9 em CDCl_3

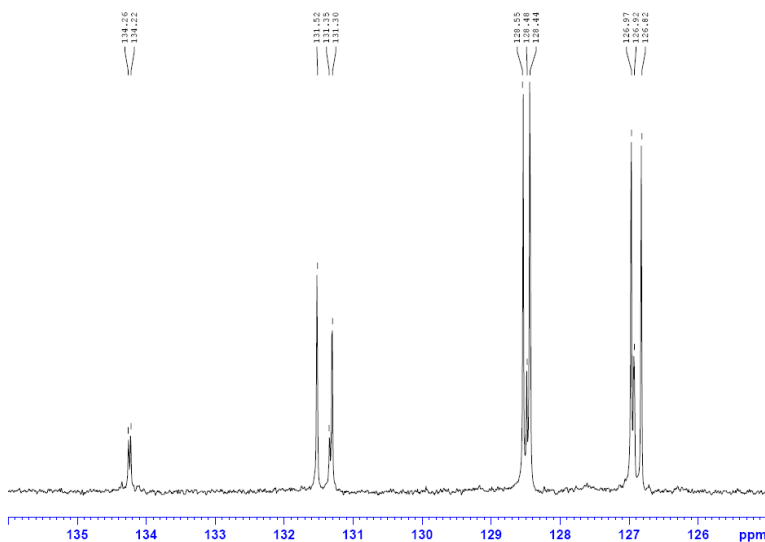


Figura 43: Espectro de RMN ^{13}C da substância B9 em CDCl_3 : ampliação da região entre δ 125 e δ 136

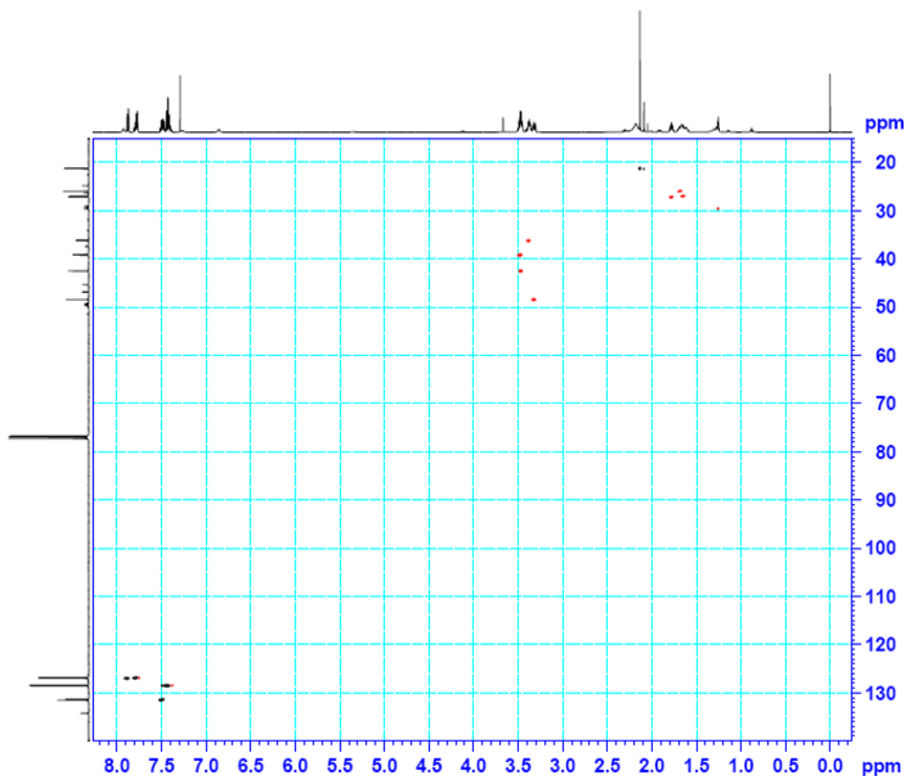


Figura 44: Espectro de correlação HSQC-DEPT 135° da substância B9 em CDCl_3

Alguns sinais do espectro de RMN ^1H não apresentam correlação de HSQC-DEPT 135° e considerando as informações do espectro de infravermelho, podem ser atribuídos aos hidrogênios ligados a nitrogênios, especificadamente δ_{H} 6,85 e δ_{H} 7,92 (tripletos alargados) (figura 45).

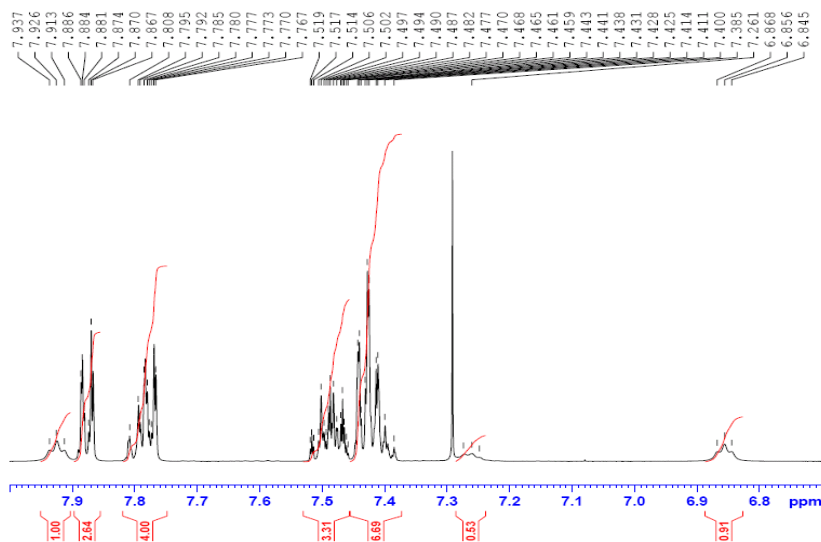


Figura 45: Espectro de RMN ^1H da substância B9 em CDCl_3 : ampliação de região entre δ 6,7 e δ 8,0

Na análise dos espectros de RMN de ^1H foi observada, em δ_{H} 2,13 (figura 46), a presença de um singlete (3H) que, por estar em uma região de desblindagem, pode ser atribuído a uma metila ligada a uma carbonila. Essa metila está correlacionada por HSQC com o carbono assinalado como δ_{C} 21,3.

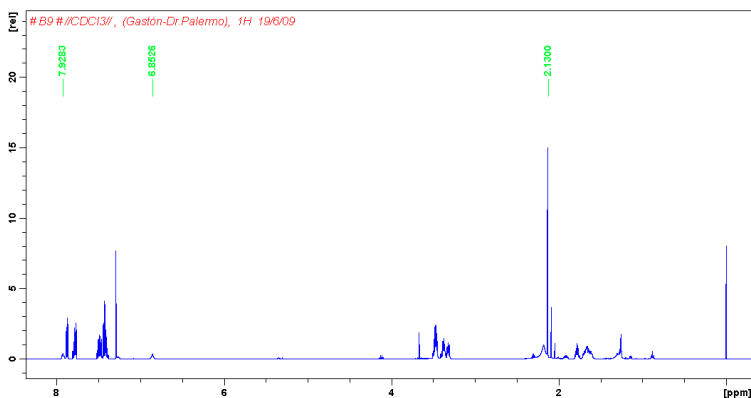


Figura 46: Espectro de RMN ^1H da substância B9 em CDCl_3

O espectro de HH-COSY forneceu informações importantes sobre a conectividade entre hidrogênios vizinhos. A ampliação do espectro de HH-COSY da figura 47 mostra os sinais referentes aos hidrogênios ligados ao nitrogênio (δ_{H} 6,85 e 7,92) correlacionando com hidrogênios metilênicos alifáticos (δ_{H} 3,47 e 3,37) permitindo propor as estruturas parciais da figura 48.

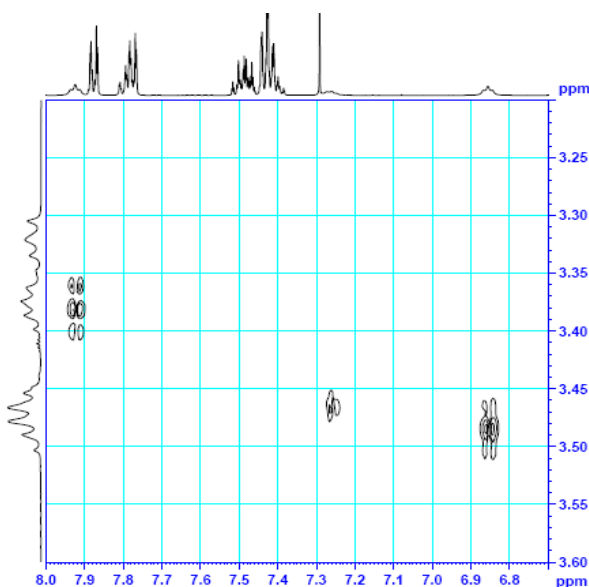


Figura 47: Espectro de correlação ^1H - ^1H da substância B9 em CDCl_3

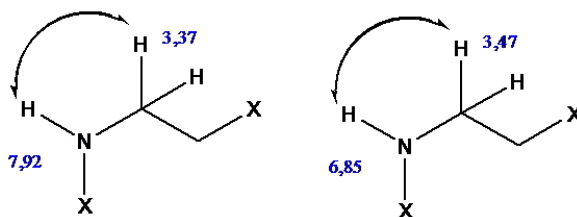


Figura 48: Acoplamentos observados nos espectros de correlação ^1H - ^1H da substância B9.

As demais correlações da cadeia alifática também foram visualizadas no espectro de COSY, indicando a presença de uma cadeia de 3 C e outra de 4 C separadas entre três nitrogênios (figura 49).

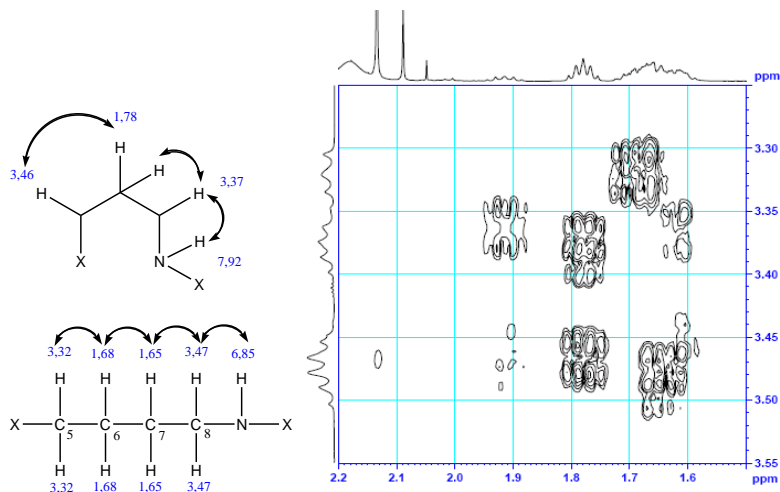


Figura 49: Acoplamentos observados nos espectros de RMN ^1H de correlação de ^1H - ^1H ; espectro de correlação ^1H - ^1H em CDCl_3 da substância B9.

Na figura 50 observa-se a presença de hidrogênios de anéis aromáticos e suas correlações.

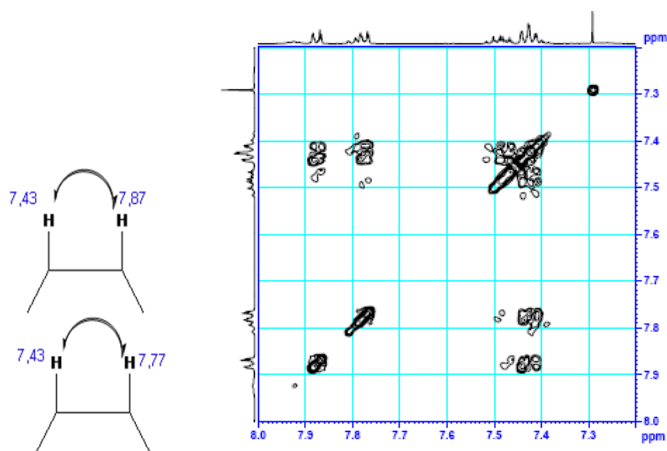


Figura 50: Acoplamentos observados nos espectros de correlação ^1H - ^1H ; espectro de correlação ^1H - ^1H em CDCl_3 da substância B9.

A partir do espectro de correlação de HMBC (figura 51 e 52) foi possível determinar a correlação dos hidrogênios com os carbonos através de 2 e 3 ligações e estabelecer as conectividades permitindo a proposição das estruturas parciais (figura 53).

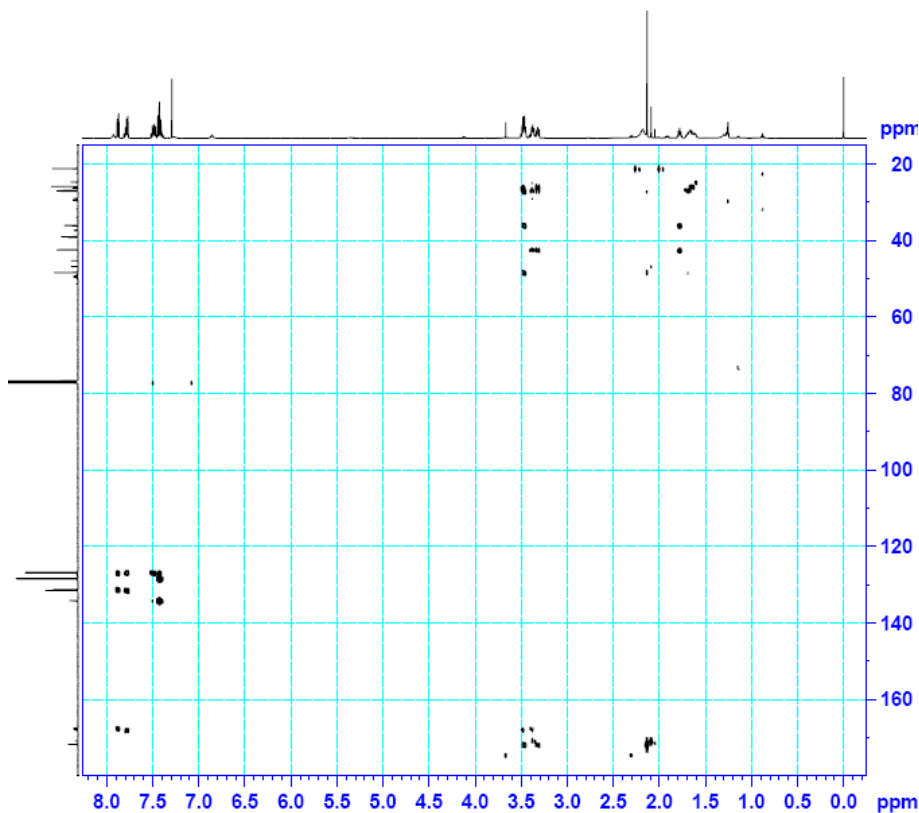


Figura 52: Espectro de correlação HMBC da substância B9 em CDCl_3

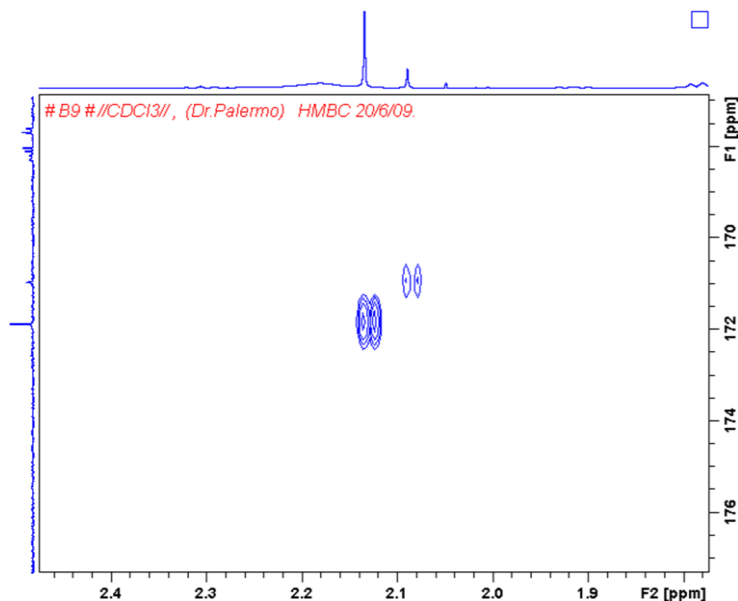


Figura 52: Ampliação do espectro de correlação HMBC da substância B9 em CDCl_3 .

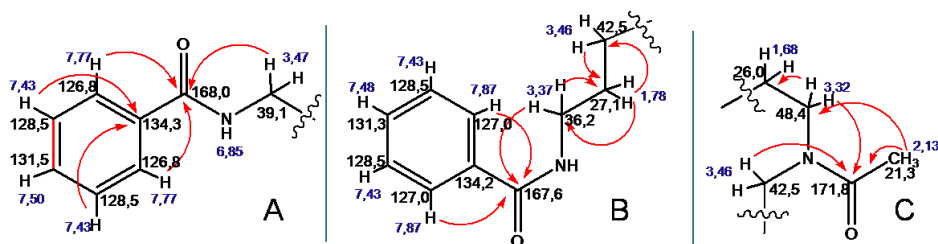


Figura 53: Acoplamentos observados nos espectros de correlação de HMBC da substância B9

O experimento de NOESY, o qual mostra as correlações entre hidrogênios no espaço (figura 54), é coerente com a estrutura proposta, mostrando a proximidade entre os hidrogênios de cada amida com os hidrogênios do anel respectivo e grupos metilenos vizinhos.

B9 # //CDCl₃// (Gastón-Dr.Palermo) , NOESYPH-GP 19-20/6/09.

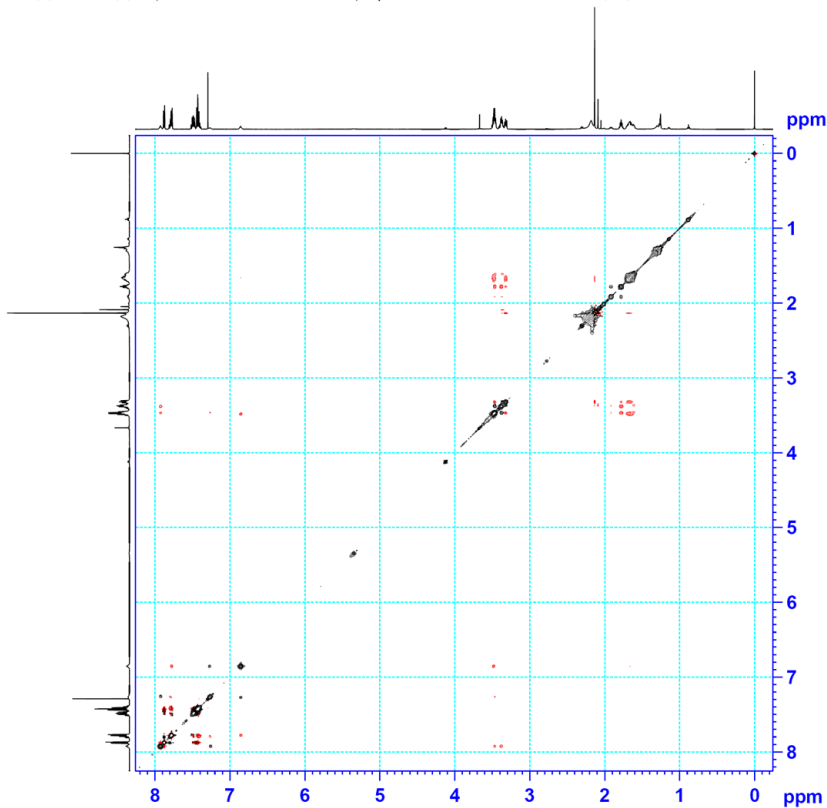


Figura 54: Espectro de NOESY da substância B9 em CDCl₃.

Todos os acoplamentos e correlações dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações podem ser ainda visualizados na tabela 4.

Tabela 4: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância B9 e correlações

δ_{C}	δ_{H}	DEPT	J (Hz), mult	COSY	NOESY	HMBC
171,8	-	C	-	-	-	-
171,8	-	C	-	-	-	-
168,0	-	C	-	-	-	-
167,6	-	C	-	-	-	-
134,3	-	C	-	-	-	-
134,2	-	C	-	-	-	-
131,5	7,50	CH	m	-	7,77	-
131,3	7,48	CH	m	-	-	-
128,5	7,43	CH	m	7,77; 7,50	7,77	-
128,4	7,43	CH	m	7,87; 7,48	7,87; 7,48	134,3
127,0	7,87	CH	m	7,43; 7,48	7,92; 7,43	167,3
126,8	7,77	CH	m	7,43; 7,50;	6,85; 7,26; 7,50; 7,43	168,0
48,4	3,32	CH ₂	t	1,68	2,13; 1,78; 1,68	171,8; 26,0
42,5	3,46	CH ₂	6,41	2,13; 1,78	7,92	171,8; 27,1
39,1	3,47	CH ₂	5,66	6,85; 1,65	1,65; 1,68; 6,85	168,0; 48,4
36,2	3,37	CH ₂	6,08; 6,62	7,92; 1,78	1,78; 7,92	167,6; 27,1
27,1	1,78	CH ₂	6,18; 6,62, qui	3,46; 3,37	3,37; 3,32	42,5; 36,1
27,0	1,65	CH ₂	m	1,68; 3,47	3,47	26,0
26,0	1,68	CH ₂	m	1,65; 3,32	3,47; 3,32	27,0
21,3	2,13	CH ₃	s	3,46	3,32	48,4
-	7,92	NH	6,08; t	3,37	3,37; 3,46; 7,87	-
-	6,85	NH	5,65; t	3,47;	3,47; 7,77; 7,26	-

O espectro de massas foi importante para definir a estrutura, a partir dos fragmentos da figura 55. Considerando a fórmula molecular agora definida pode-se propor a estrutura.

O espectro de massas de alta resolução da substância B9, obtido no modo positivo com fotoionização em pressão atmosférica (APPI) mostrou (figura 55) como íon de maior massa $m/z = 396,23313$, indicando a fórmula molecular $C_{23}H_{30}N_3O_3$ sob a forma de molécula protonada (valor calculado 396,2287) e portanto a fórmula molecular é $C_{23}H_{29}N_3O_3$ para a substância B9. A partir do experimento de MS/MS da molécula protonada 396,23313, os fragmentos observados foram os seguintes: m/z 354,21780 ($C_{10}H_{20}NO^+$); m/z 336,20729 ($C_{21}H_{26}N_3O^+$); m/z 275,17879 ($C_{16}H_{23}N_2O_2^+$); m/z 233,16672 e m/z 162,09337 ($C_{10}H_{12}NO^+$) (figuras 55-63).

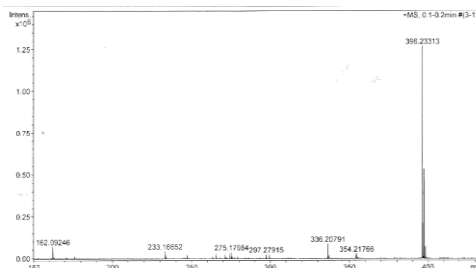


Figura 55: Espectro de Massas (APPI) da substância B9.

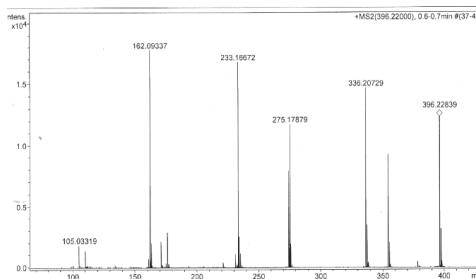


Figura 56: Espectro de Massas MS2 do íon 396 (APPI) da substância B9.

A formação do íon m/z 378, 21824 ($C_{23}H_{28}N_3O_2^+$) pode ser explicada pela perda da molécula de água (figura 57).

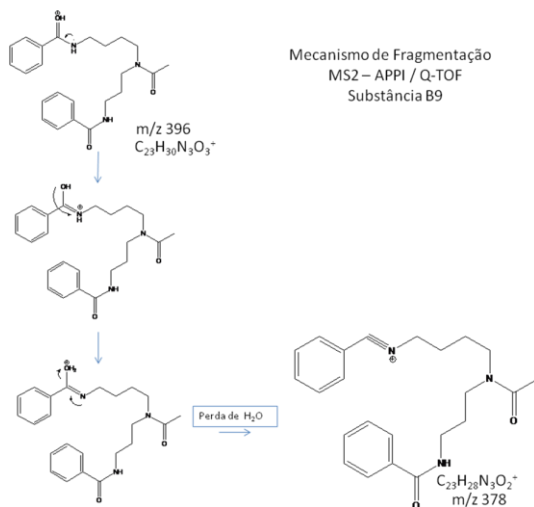


Figura 57: Proposta de fragmentação da molécula protonada m/z 396 ao íon m/z 378 da substância B9 através dos experimento MS2 (APPI)

A formação do íon m/z 354, 21780 pode ser explicada pela eliminação de cetena (figura 58). A eliminação da cetena como molécula neutra também é observada na fragmentação do íon m/z 378, 21824 (figura 60).

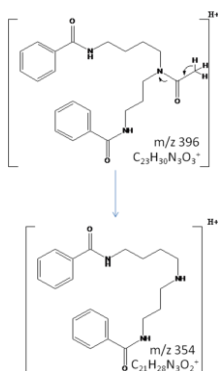


Figura 58: Proposta de fragmentação da molécula protonada m/z 396 ao íon m/z 354 da substância B9 através dos experimento MS2 (APPI)

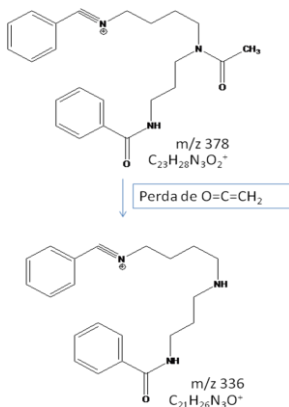


Figura 59: Proposta de fragmentação do fragmento m/z 378 ao íon m/z 336 da substância B9 através dos experimento MS2 (APPI)

A eliminação da benzamida como molécula neutra resulta na formação do íon m/z 274 (figura 60).

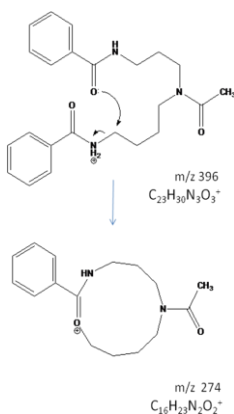


Figura 60: Proposta de fragmentação da molécula protonada m/z 396 ao íon m/z 274 da substância B9 através dos experimento MS2 (APPI)

A realização do experimento de MS/MS do íon m/z 354,21780 (figura 61) com a fórmula $C_{10}H_{20}NO^+$ forneceu o fragmento m/z 162,09231, o qual pode ser explicado conforme a figura 62.

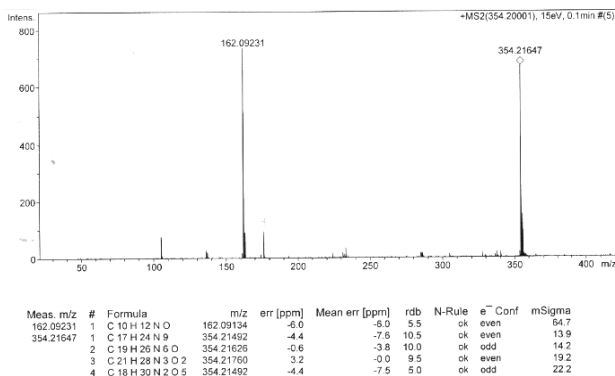


Figura 61: Espectro de Massas MS2 do íon 354 (APPI) da substância B9

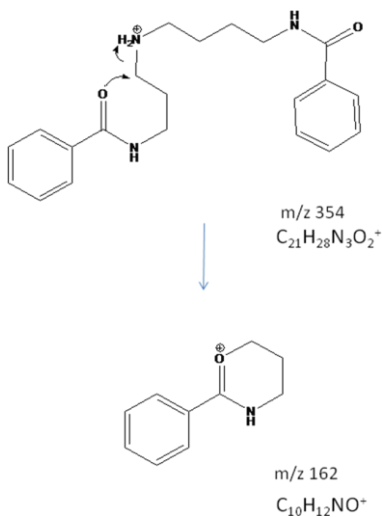


Figura 62: Fragmentação do íon m/z 354 ao íon m/z 162 pelo procedimento de MS2 (APPI)

Dessa forma, os espectros de alta resolução, em conjunto com os dados de RMN permitem propor a estrutura do composto B9 como N¹,N⁸-dibenzoileespermidil-N⁴-acetamida (Figura 63).

Um derivado do alcaloide espermidina semelhante ao isolado (Figura 64), foi relatado por Alemayehu e colaboradores (1988), como constituinte da espécie *Cassia floribunda* Cav. (Fabaceae). Seus dados espectroscópicos estão descritos na tabela 5, comparando-os com os valores referentes à substância B9.

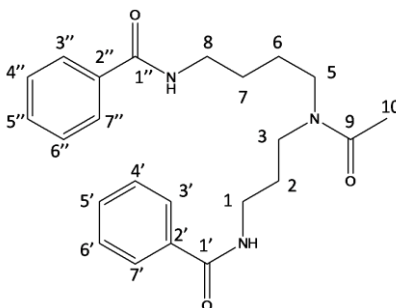


Figura 63: Estrutura da substância isolada de *B. parviflora* B9

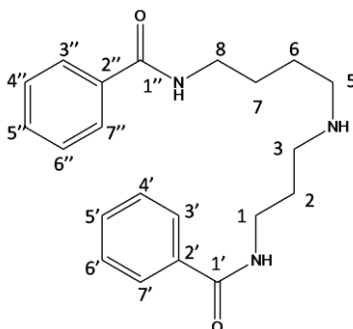


Figura 64: Estrutura da substância N1,N8-dibenzoileespermidina (Alemayehu et al., 1988).

Tabela 5: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância B9 e da literatura

^{13}C	<i>B9</i> (CDCl_3)		<i>N1,N8-</i> <i>dibenzoileespermidina</i> (<i>Alemayehu et al.</i> , 1988; CDCl_3)	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	3,37	36,2	3,5	39,84
2	1,78	27,1	1,5-1,7	28,42
3	3,46	42,5	2,75	48,78
4	-	-	2,1	-
5	3,32	48,4	2,65	49,35
6	1,68	26	1,5-1,7	27,47
7	1,65	27	1,5-1,7	27,42
8	3,47	39,1	3,4	39,78
9	-	171,8	-	-
10	2,13	21,3	-	-
$^8\text{C-NH}$	6,85	-	6,65	
$^1\text{C-NH}$	7,93	-	7,92	
1'	-	167,6		167,23
2'	-	134,2		134,74
3'; 7'	7,87	127,0		126,83
4'; 6'	7,43	128,5		128,44
5'	7,48	131,3		131,11
1''	-	168,0		167,48
2''	-	134,3		134,79
3''; 7''	7,77	126,8		126,80
4''; 6''	7,43	128,5		128,34
5''	7,50	131,5		131,25

5.1.3 Investigação química de *Verbesina subcordata* DC.

O estudo químico das partes aéreas da espécie *Verbesina subcordata* DC. foi realizado com o extrato diclorometano das folhas. O extrato foi submetido a sucessivos procedimentos cromatográficos para resultar no isolamento da substância SV1 (5 mg). A elucidação estrutural da substância é descrita a partir do item 5.1.2.3 com a apresentação dos espectros.

5.1.3.1 Rendimento dos extratos

As extrações das folhas de *V.subcordata* em diclorometano apresentaram o seguinte rendimento:

Tabela 6: Rendimento dos extratos de *Verbesina subcordata* DC

200 g de Folhas	Extrato CH_2Cl_2
Secas e Moídas	10,5 g
Rendimento*	5,25 %

*Percentual em relação aos 200 g de folhas extraídas.

5.1.3.2 Análise cromatográfica, isolamento e purificação das frações de *Verbesina subcordata* DC

As metodologias foram empregadas com o objetivo de isolamento de peróxidos do extrato diclorometano das folhas de *V. subcordata* através da coluna 1VS (item 4.6.1.1), a fração 32-35 foi submetida a purificação pela coluna 2 VS (item 4.6.1.2), obtendo-se a substância SV1 (figura 65). A substância SV1 além de apresentar extinção de fluorescência em UV_{256nm} e coloração vermelho-púrpura com o revelador anisaldeído-sulfúrico, também apresentou reação positiva para o reagente para peróxidos de Huber e Fröhlke.

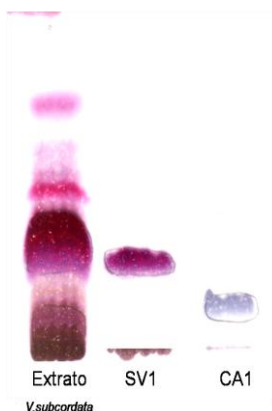


Figura 65: Análise cromatográfica do extrato diclorometano de *V. subcordata* e das substâncias isoladas SV1 e CA1. Fase móvel: clorofórmio, Revelador: Anisaldeído-sulfúrico.

5.1.3.3 Elucidação estrutural das substâncias SV1

O composto SV1 foi purificada através de métodos cromatográficos e em sua análise apresentou-se como somente uma mancha de coloração violeta ao revelar com anisaldeído-sulfúrico. Foi então analisada por métodos espectroscópicos a fim de elucidar a sua estrutura. A análise detalhada dos espectros de RMN de ^{13}C indicou 42 sinais referentes a carbono, alguns dos sinais duplicados ou quaduplicados foram observados, indicando a possibilidade de mistura.

Algumas outras inconsistências apontaram para a possibilidade de tratar-se de uma mistura. Ao analisar os espectros de correlação de COSY e HMBC foi possível confirmar a presença de uma mistura de duas substâncias e não uma só.

Foi possível a elucidação das duas substâncias tendo em vista as análises detalhadas dos espectros que apresentavam uma boa resolução.

A comprovação da mistura decorre principalmente da observação da presença de dois grupos cinamatos. Os espectros apresentaram-se semelhantes aos de CA1, sugerindo tratar-se de dois derivados eudesmanos.

No espectro de RMN de ^1H foi observada a presença de sete metilas (uma na região de δ_{H} 1,09, uma em δ_{H} 1,03, duas em δ_{H} 0,87 e uma em δ_{H} 1,68 e duas em δ_{H} 1,05) (figura 66 e 67).

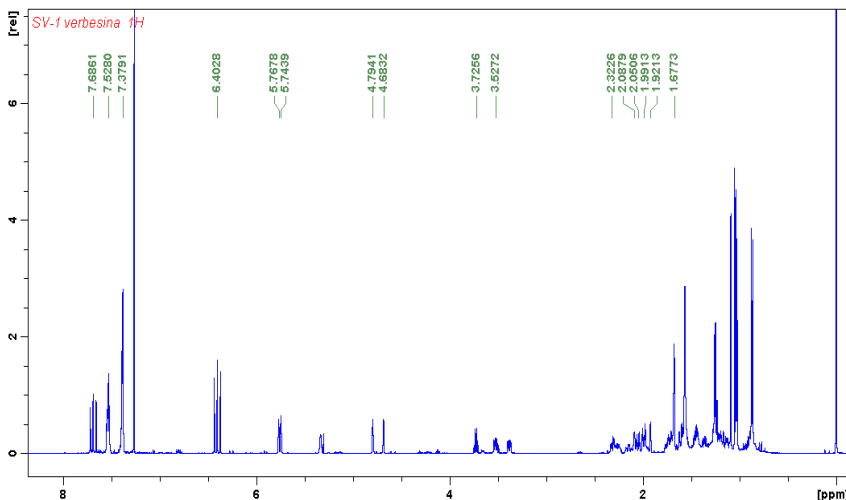


Figura 66: Espectro de RMN ^1H das substâncias SV1a e SV1b em CDCl_3

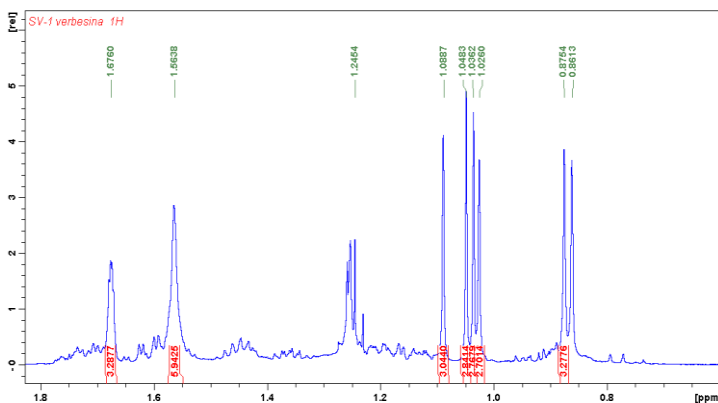


Figura 67: Espectro de RMN ^1H das substâncias SV1a e SV1b em CDCl_3 , ampliação da região entre δ_{H} 0 e δ_{H} 1,8.

No espectro de HSQC-DEPT 135° pode-se observar a presença de sinais de 10 carbonos de CH_2 e ainda sete carbonos quaternários (ausentes no espectro de HSQC) (figura 68 e 69). Todos os hidrogênios foram relacionados aos seus respectivos carbonos através do experimento de HSQC.

Uma das estruturas codificada como SV1a apresenta 4 metilas, 3 CH_2 , 13 CH e 4 C e a outra codificada como SV1b possui 3 metilas, 5 CH_2 , 12 CH e 4 C .

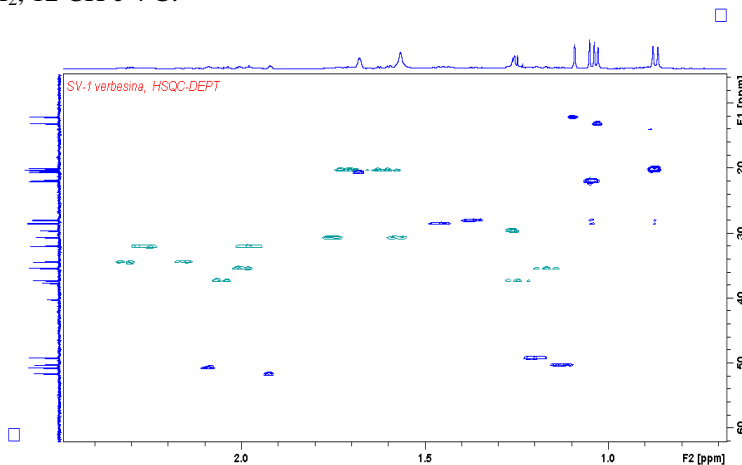


Figura 68: Espectro de correlação HSQC-DEPT 135° em CDCl_3 , ampliação da região entre δ_{H} 0 e δ_{H} 3,0 e δ_{C} 0 e δ_{C} 60

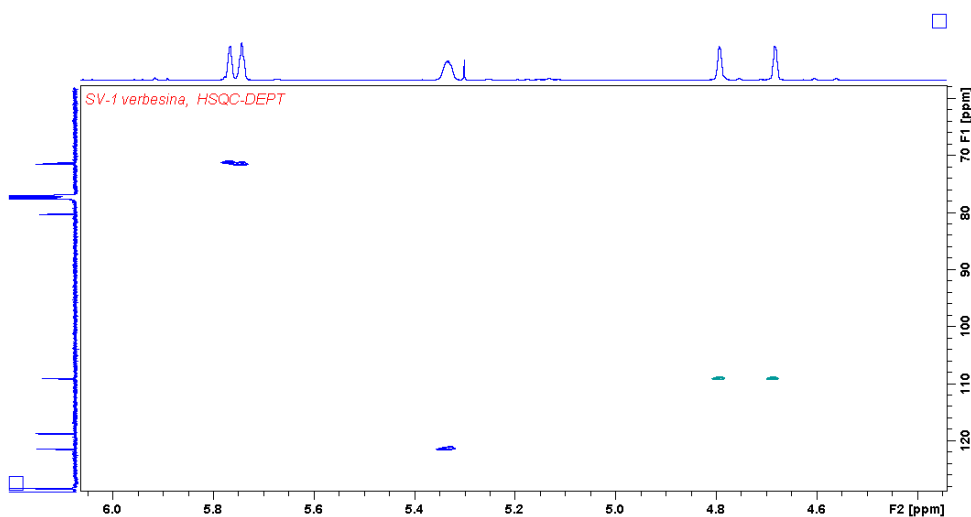


Figura 69: Espectro de correlação HSQC-DEPT 135° em CDCl_3 , ampliação da região entre δ_{H} 4,4 e δ_{H} 6,0 e δ_{C} 60 e δ_{C} 130

A presença de dois ésteres do ácido cinâmico pode ser observada através das integrações dos sinais do espectro de RMN de ^1H entre δ 6,4 e δ 7,68 para dois grupos de anéis aromáticos (12C) e de olefina (2C) (figura 70). Os duplos-dubletos em 7,68 ppm e 6,4 ppm apresentam constante de acoplamento de 14,92 Hz sugerindo que estes hidrogênios estão acoplados e que esse grupamento olefínico do grupamento cinamato apresenta a estereoquímica trans para os dois compostos.

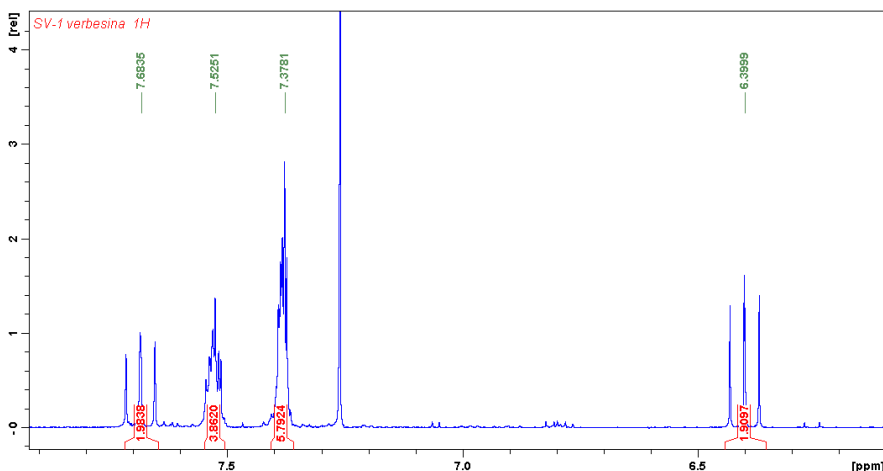
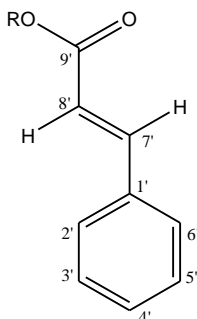


Figura 70: Espectro de RMN ^1H das substâncias SV1a e SV1b em CDCl_3 , ampliação da região entre δ 6,4 e δ 8,0

Além desses sinais referentes aos ésteres do ácido cinâmico, restaram 30 carbonos, sugerindo a presença de sesquiterpenos.

As duas estruturas, SV1a e SV1b, diferem entre si principalmente pela dupla ligação. O sinal δ 5,33 do RMN de ^1H (figura 71) é atribuído ao hidrogênio olefínico endocíclico da porção terpênica da substância SV1a. Já os sinais referentes à substância sV1b em δ 4,79 e δ 4,68 do RMN de ^1H (figura 71) desdobram-se como dubletos com constantes de acoplamento pequenas (0,9 Hz) referentes aos hidrogênios geminais de olefinas, caracterizando uma dupla ligação exocíclica.

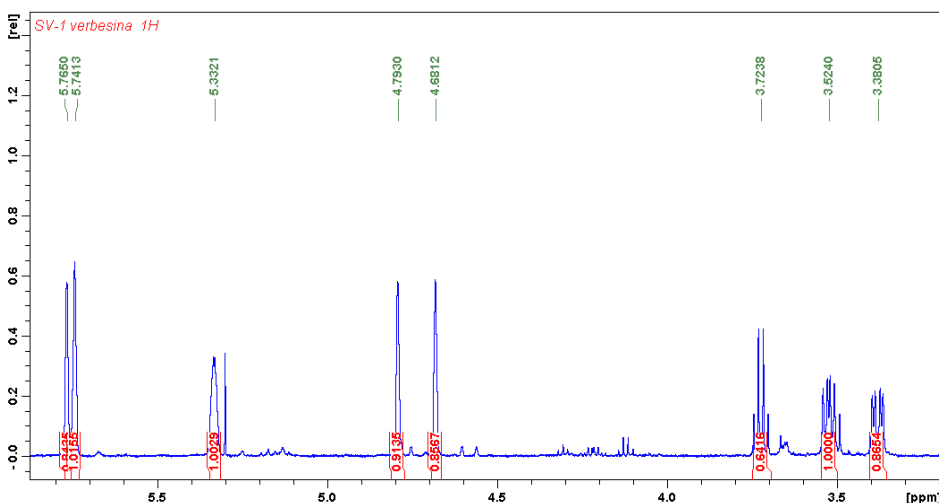


Figura 71: Espectro de RMN ^1H das substâncias SV1a e SV1b em CDCl_3 , ampliação entre δ 3,3 e δ 5,8.

A presença dos anéis trans-decalina, também presentes na substância CA1, foi constatada através dos acoplamentos observados no COSY ^1H - ^1H (figura 72 e 73) e HMBC (figura 74) partindo das duplas ligações presentes nas duas estruturas dos sesquiterpenos descritas anteriormente.

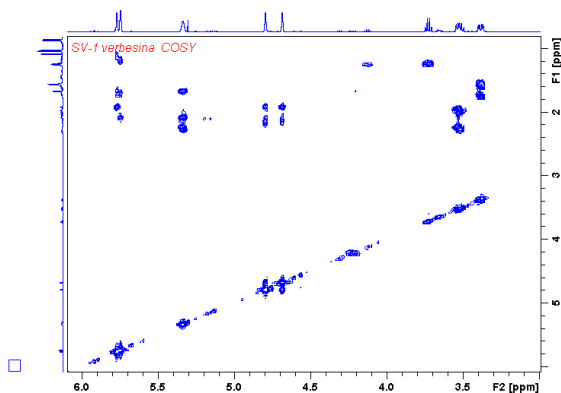


Figura 72: Espectro de COSY ^1H - ^1H da substância SV1 em CDCl_3 : ampliação.

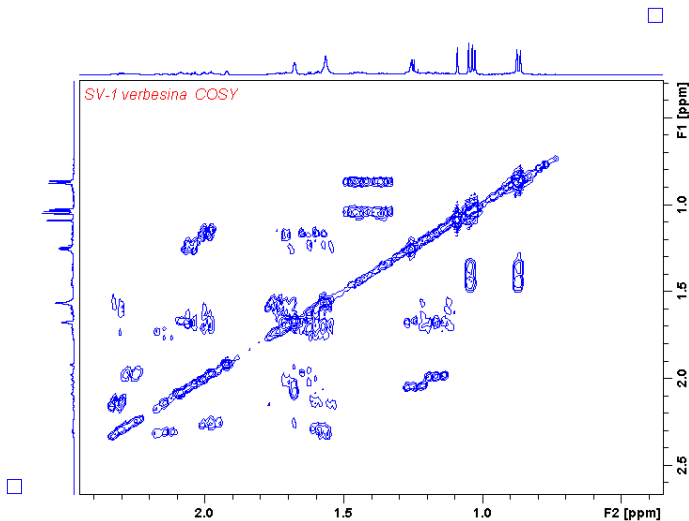


Figura 73: Espectro de COSY ^1H - ^1H da substância SV1 em CDCl_3 : ampliação

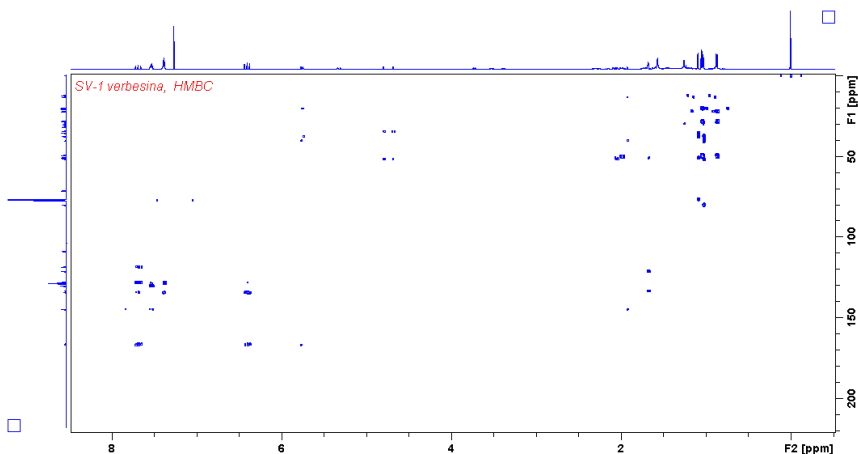


Figura 74: Espectro de correlação HMBC da substância SV1 em CDCl_3

Diferente da substância CA1, as substâncias SV1a e SV1b apresentam em sua estrutura uma hidroxila em sua porção sesquiterpênica caracterizada por um sinal no espectro de RMN ^1H em δ 3,52 e δ 3,38 respectivamente (figura 75), esses sinais apresentam correlação com os hidrogênios e carbonos vizinhos, permitindo formar parcialmente as estruturas de SV1a e SV1b (figura 76 e 77).

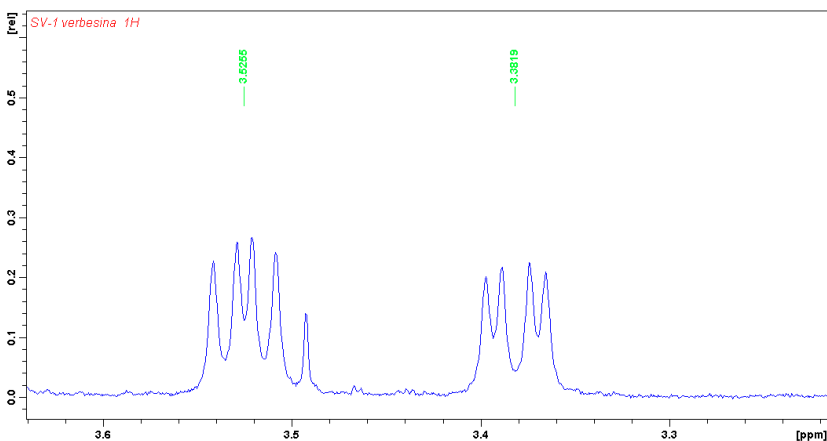


Figura 75: Ampliação da região entre δ 3,2 e δ 3,7 do RMN ^1H das substâncias SV1a e SV1b em CDCl_3 .

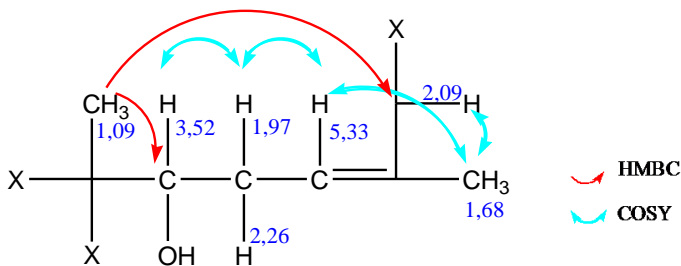


Figura 76: Acoplamentos de COSY ^1H - ^1H e HMBC da substância SV1a

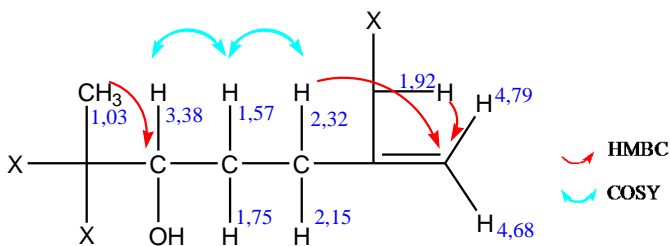


Figura 77: Acoplamentos de COSY ^1H - ^1H e HMBC da substância SV1b

Através da análise dos acoplamentos descritos nas tabela 7 e 8 pôde-se montar a porção sesquiterpênica das duas substâncias demonstradas na figura 78.

Tabela 7: Dados obtidos através de RMN ^1H , ^{13}C e correlações (500 e 125 MHz) da substância SV1a em CDCl_3 .

	^{13}C		^1H	COSY	HMBC	NOESY
1	76,7	CH	3,52	1,97; 2,26	1,09	1,16; 1,57
2	32,1	CH_2	1,97; 2,26	3,52; 1,99	-	-
3	121,2	CH	5,33	2,09	1,68	1,68
4	133,5	C	-	-	1,68	-
5	50,8	CH	2,09	5,33; 5,74	1,68; 1,09; 3,38	-
6	71,3	CH	5,74	1,19; 2,09	1,62	1,05; 1,46; 1,68
7	49,2	CH	1,19	5,74	1,05; 0,87	-
8	20,3	CH_2	1,7; 1,6	-	-	-
9	35,5	CH_2	1,99; 1,16	1,68; 2,26	3,52; 1,09	3,52
10	37,8	C	-	-	1,99; 1,16; 1,09	-
11	28,6	CH	1,46	1,05; 0,87	1,46; 0,87	-
12	20,1	CH_3	0,87	1,37; 1,46	1,05	-
13	22,1	CH_3	1,05	-	-	-
14	20,7	CH_3	1,68	1,9; 2,05; 2,09; 5,33; 5,76	-	-
15	12,2	CH_3	1,09	5,76	3,52	-
1'	134,4	C	-	-	7,68; 7,38; 6,4	-
2'; 6'	128,1	CH	7,53	7,38	7,68; 7,38	6,4; 7,38; 7,68
3'; 5'	128,8	CH	7,38	7,53	7,53	7,53
4'	130,2	CH	7,38	-	7,53	-
7'	144,7	CH	7,68	6,40	7,53	7,53
8'	118,6	CH	6,40	7,68	7,68	-
9'	166,3	C	-	-	6,40	-

Tabela 8: Dados obtidos através de RMN ^1H , ^{13}C e correlações (500 e 125 MHz) da substância SV1b em CDCl_3 .

	^{13}C		^1H	COSY	HMBC	NOESY
1	80,1	CH	3,38	1,57; 1,75; 1,57	1,03	2,15; 1,92; 1,75; 1,24; 1,57
2	30,7	CH_2	1,57; 1,75	3,38; 2,32	-	3,53; 3,38
3	34,5	CH_2	2,32; 2,15	1,57	4,79; 4,68	-
4	144,9	C	-	-	-	-
5	51,7	CH	1,92	5,76; 1,67	4,79; 4,68; 2,05; 1,03	1,12; 3,38; 5,76
6	71,1	CH	5,76	1,09; 1,68	-	1,05; 4,68; 1,92; 1,37
7	50,3	CH	1,12	-	1,99; 0,87	1,99
9	37,3	CH_2	1,24; 2,05	3,38; 1,68	1,03; 3,38	3,38
10	40,3	C	-	-	1,92; 1,24; 1,03	-
11	28,1	CH	1,37	0,87	1,37; 1,05; 0,87	-
12	20,1	CH_3	0,87	1,37; 1,46	1,05	-
13	21,9	CH_3	1,05	1,46; 1,37	1,16; 0,87	-
14	108,9	CH_2	4,79; 4,68	-	1,92; 2,32	-
15	13,2	CH_3	1,03	-	3,38	-
1'	134,4	C	-	-	7,68; 7,38; 6,4	-
2'; 6'	128,1	CH	7,53	-	-	-
3'; 5'	128,8	CH	7,38	7,53	7,53	7,53
4'	130,2	CH	7,38	-	7,53	-
7'	144,8	CH	7,68	6,40	-	-
8'	118,5	CH	6,40	7,68	-	-
9'	166,8	C	-	-	7,68	-

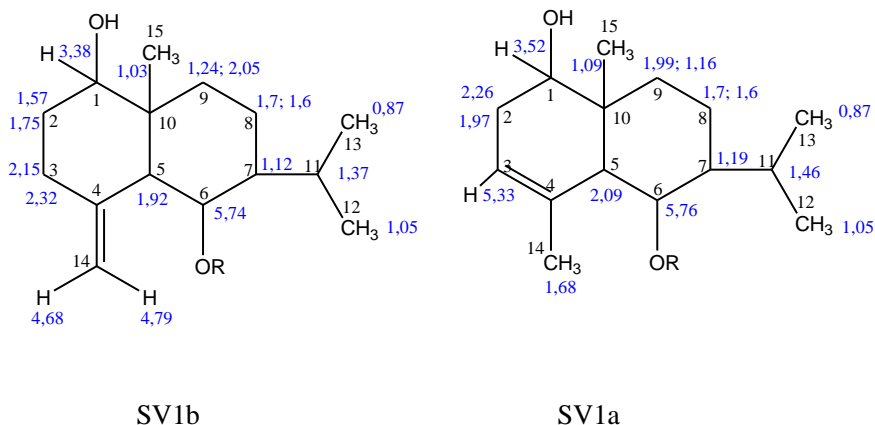


Figura 78: Estruturas parciais das substâncias SV1b e SV1a

Unindo a parte terpênica ao ácido cinâmico, as substâncias SV1a e SV1b correspondem respectivamente aos sesquiterpenos do tipo eudesmano, cinamato do 1-hidróxi-6-epi- α -verbesinol e cinamato de 1-hidróxi-6-epi- β -verbesinol (figura 79).

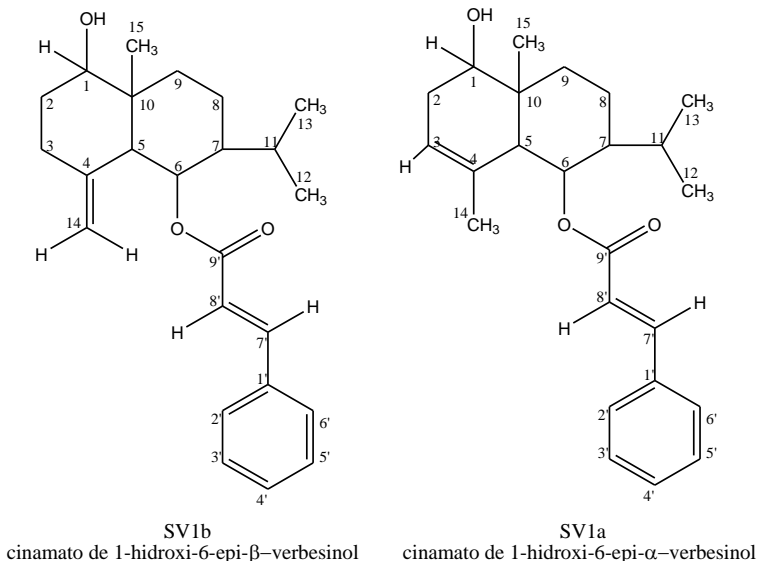


Figura 79: Estrutura das substâncias cinamato do 1-hidróxi-6-epi- α -verbessinol e cinamato de 1-hidróxi-6-epi- β -verbessinol

Mais de 450 esqueletos sesquiterpênicos do tipo eudesmano são conhecidos, os quais são originados a partir de substratos simples. A biossíntese dos sesquiterpenos ocorre a partir da condensação de três unidades isoprênicas compostas de 5 carbonos cada através de reações enzimáticas. As unidades se conectam de forma cauda-cabeça para constituir o núcleo eudesmano a partir do seu precursor farneseno; o carbono 1 se liga ao carbono 10 e o carbono 2 se liga ao 7, formando o biciclo do tipo trans decalina, característico dos sesquiterpenos do tipo eudesmano, que apresenta um radical isopropila na posição 10 conforme é apresentado em esquema na figura 80 (BREITMAIER, 1999)

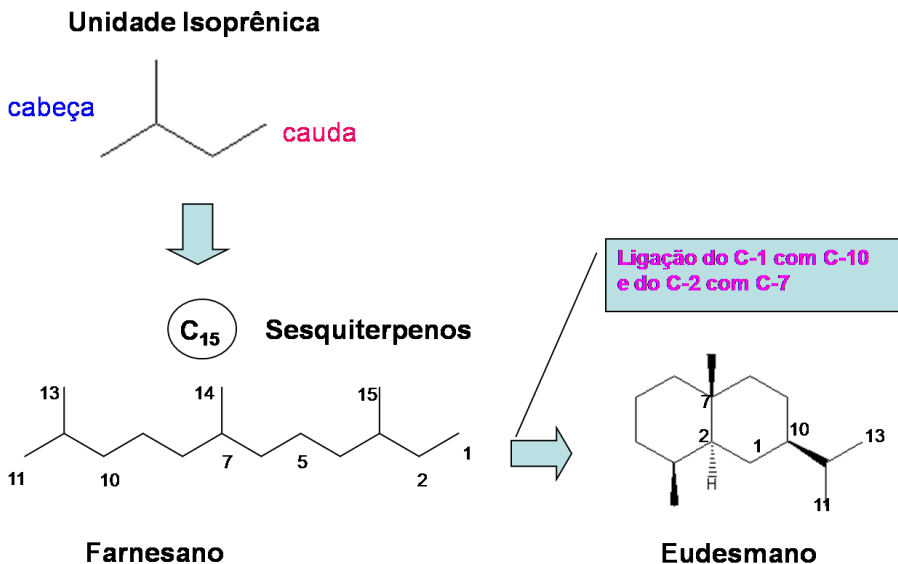


Figura 80: Biossíntese do sesquiterpeno do tipo eudesmano.

No esqueleto eudesmano, observa-se a formação de diferentes estruturas de acordo com a posição da dupla, α , β e γ -eudesmanos (figura 81).

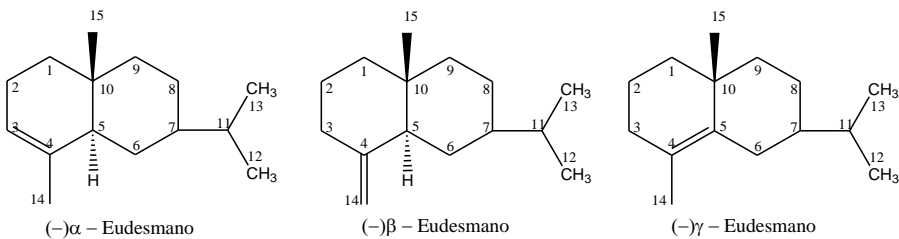


Figura 81: Sesquiterpenos do tipo eudesmano.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os peróxidos isolados de espécies vegetais têm apresentado promissoras atividades antiparasitária e antitumoral. O ascaridol, artemisinina e seus derivados são exemplos de fármacos presentemente utilizados na terapêutica como anti-helmínticos e antimaláricos, respectivamente (TOLSTIKOV et al., 1996; MESHNICK et al., 1996; CASTEEL, 1999; DEMBITSKY, 2008).

Além das usuais, outras atividades estão sendo descobertas para esses compostos, como, por exemplo, antiviral, antitumoral e imunossupressora (EFFERTH et al., 2002). Mais especificamente, o artesunato, comumente utilizado no tratamento dos casos severos da malária, vem apresentando resultados promissores como agente antiviral e antitumoral (EFFERTH et al., 2001; EFFERTH et al., 2002; KAPTEIN et al., 2006).

Na atualidade os peróxidos de origem marinha têm ganhado destaque apresentando uma grande diversidade estrutural e atividades biológicas promissoras, como por exemplo, a atividade antitumoral dos compostos isolados das esponjas da Família Plakiniidae, como os endoperóxidos policetídeos Plakortídeos F, M e N (Figura 82) e os endoperóxidos de norsesterpenos, diacarnoxídeos A-D da esponja *Diacarnus levii* (Latrunculiidae) (JIMÉNEZ et al., 2003; HOLZWARTH et al., 2005; DAI et al., 2007).

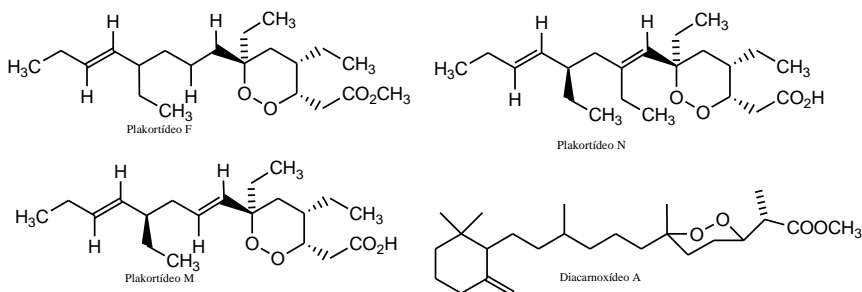


Figura 82: Estruturas de substâncias com grupamento peróxidos das espécies de esponjas do gênero *Plakortis* e *Diacarnus*

No presente trabalho, as espécies *Verbesina subcordata* DC, *Calea phyllolepis* Baker e *Banara parviflora* (A.Gray) Benth. foram investigadas quanto a presença de peróxidos, tendo em vista os resultados positivos em triagem anterior realizada por Schenkel e colaboradores (2002).

Utilizando a análise cromatográfica e um reagente capaz de detectar peróxidos, o Reagente de Huber e Fröhlke. Essas espécies selecionadas, com base em triagem prévia, foram novamente testadas e apresentaram resultado positivo. Todavia os procedimentos utilizados de fracionamento dos extratos embora tenham conduzido a compostos isolados, não resultaram em compostos com grupamentos peróxidos. Possivelmente o insucesso na obtenção desses compostos pode decorrer da baixa estabilidade desses compostos e/ou presença minoritária nos extratos ou, ainda, outros fatores relacionados com a infra-estrutura disponível no laboratório naquele período, como a impossibilidade de trabalho com solventes recentemente destilados. Por outro lado há que considerar que entre os compostos obtidos, estão compostos terpênicos que já foram encontrados como peróxidos da espécie *Verbesina subcordata* DC. (Figura 83), o que sugere a hipótese de ter ocorrido decomposição desses hidroperóxidos pouco estáveis. As ligações do grupamento peróxido (O – O) são as ligações covalentes mais frágeis encontradas nos compostos orgânicos, com uma média de energia de ligação de 34 Kcal/mol (menos da metade da energia da ligação simples C – C) (JIN et al., 2005).

Para a espécie *Verbesina subcordata* DC. foram isolados os sesquiterpenos do tipo eudesmano SV1a e SV1b (1 e 2) e da espécie *Calea phyllolepis* foi isolado o cumarato do sesquiterpeno 6-epi- β -verbesinol (figura 84), semelhantes a outros já descritos para outras espécies dos gêneros. As substâncias SV1a e SV1b, em mistura, apresentaram reação positiva para peróxidos com o reagente de Huber e Frölke podendo ser um indicativo de que o hidroperóxido isolado anteriormente de *Verbesina subcordata* DC. estivesse presente nessa fração e que sua detecção não foi possível

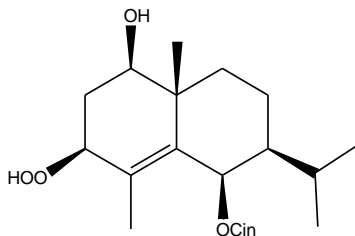


Figura 83: Hidroperóxido do sesquiterpeno do tipo cinamoil-eudesmano isolado da espécie *Verbesina subcordata* DC. por Jakupovic e colaboradores (1987).

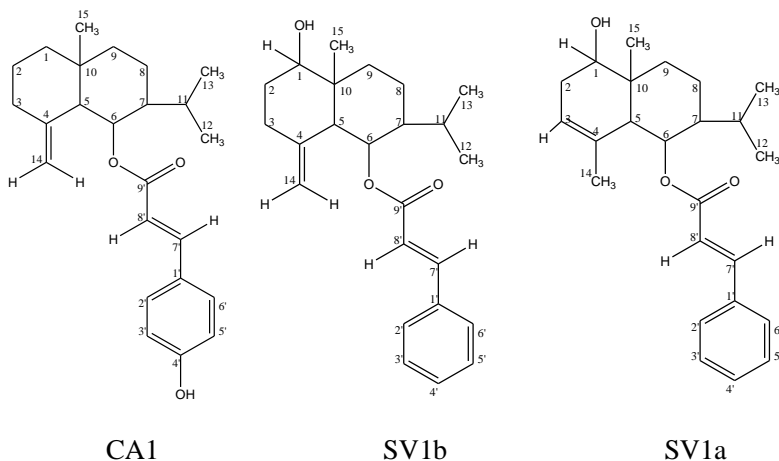


Figura 84: Estrutura das substâncias isoladas de *C. phyllolepis* e *V. subcordata*, CA1, SV1b e SV1a.

Cabe ressaltar, a semelhança das estruturas obtidas com o hidroperóxido (figura 2) já decritos em Asteraceae especificadamente para a espécie *Verbesina subcordata*.

B. parviflora é outra das espécies das plantas estudadas para a qual foi verificado reação positiva no teste de Huber e Fröhlike em triagem realizada por Schenkel e colaboradores (2002). Até o momento, na revisão da literatura, não foram encontrados trabalhos publicados de estudos químicos. Até mesmo para o gênero *Banara* há escassos trabalhos científicos com relatos de dados ecológicos, estudos de

triagem de atividade biológica e usos populares pela medicina tradicional. Portanto, para a espécie está sendo relatado pela primeira vez, presença de substâncias presentes tanto no extrato CH_2Cl_2 como no extrato etanólico das folhas de *B. parviflora*, do flavonóide C-glicosídeo também bastante presente em diversas espécies orientina (figura 85), e o alcaloide derivado de espermidina N^1, N^8 -dibenzoileespermidil- N^4 -acetamida (figura 86), este último apresentando estrutura ainda não descrita na literatura. Considerando a possibilidade de ser um artefato, foram realizadas análises cromatográficas comparando o extrato utilizado para o isolamento e ainda novos extratos da planta com a substância isolada, em todos os extratos a substância apareceu evidente.

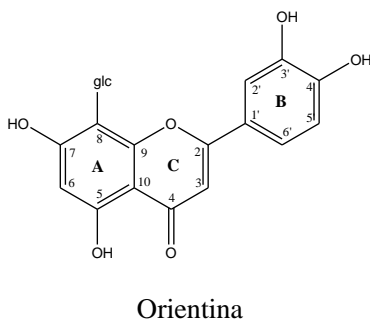


Figura 85: Estrutura da substância isolada de *B. parviflora* B10

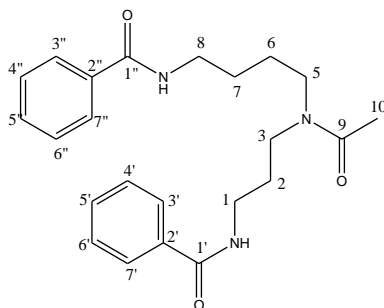


Figura 86: Estrutura da substância isolada de *B. parviflora* B9

Derivados de espermidina e seus derivados também foram isolados de plantas de outras famílias como Celastraceae, Lamiaceae, Flacourtiaceae, Equinaceae, Apocynaceae, Cannabaceae, Cruciferae e Gyrostemonaceae.

Esses alcaloides, como a espermidina e a putrescina (Figura 87), são poliaminas por possuírem pelo menos duas unidades de aminas como parte de uma cadeia alifática, geralmente constituída de três ou quatro unidades de metilenos. Pela presença desses nitrogênios, as poliaminas diferem em suas características das monoaminas conferindo basicidade acentuada e aumentando a capacidade de complexação com metais, uma das propriedades que vem sendo investigada (BIENZ et al., 2005)

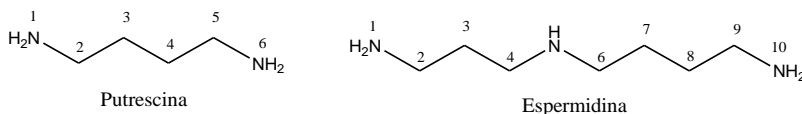


Figura 87: Estruturas das substâncias Putrescina e Espermidina

Um derivado do alcaloide espermidina semelhante ao isolado foi relatado por Alemayehu e colaboradores (1988), como constituinte da espécie *Cassia floribunda* Cav. (Fabaceae). Outros derivados da espermidina já foram isolados de outras espécies, como é o caso do N¹, N¹⁰-di-dihidrocafeoil-espermidina isolada do extrato metanólico de *Ichroma cyaneum* (Solanaceae) e da diferuol-espermidina isolada da espécie *Corylus avellana* L. (Betulaceae) (SATTAR, et al., 1990; MEURER et al., 1986).

Derivados da espermidina há tempos tem sido de interesse da química orgânica e da bioquímica. O derivado do alcaloide espermidina, N⁴-[N-(2-hidroxibenzoil)treonil]-N¹, N⁸-bis(2,3-dihidroxibenzoil) espermidina, obtido da bactéria *Micrococcus denitrificans*, apresenta ação queladora de ferro podendo ser utilizada no tratamento de condições de sobrecarga de ferro, este composto e outros derivados já puderam ser sintetizados a partir de N⁴-benzil-espermidina (BERGERON et al., 1980). Alguns derivados do tipo glicocinamoil-espermidina já demonstraram ser potentes antibióticos em modelos de infecção por *E.coli* induzida em camundongos via subcutânea (ED₅₀ que varia de 0,08-1,0 mg/Kg para as diversas misturas de derivados testados) e testes de toxicidade aguda via subcutânea em camundongos

(32-256 mg/Kg) (HLAVKA et al., 1978), através de estudos com ribossomos de reticulócitos de coelhos, a espermidina apresentou ainda efeitos na síntese do DNA na iniciação peptídica (KONECKI et al., 1975).

Neste contexto em vista da potencial atividade biológica desses compostos, os peróxidos constituem um grupo interessante a ser investigado, por outro lado especialmente para os hidroperóxidos são necessários muitos cuidados nos procedimentos desde a coleta, preparação de extratos e até procedimentos de separação e de armazenamento.

7 CONCLUSÕES

- A presença de peróxidos foi detectada nos extratos diclorometano das folhas das três espécies estudadas. Alguns desses compostos foram isolados através dos métodos cromatográficos, entretanto as quantidades obtidas mostraram-se insuficientes para a determinação estrutural.

- O sesquiterpeno do tipo eudesmano cumarato de 6-epi- β -verbesinol foi isolado do extrato diclorometano dos ramos de *Calea phyllolepis* Baker. Essa substância já foi relatada anteriormente para outras espécies, inclusive do gênero *Calea*, no entanto ainda não havia sido descrita para a espécie *C. phyllolepis*.

- Do extrato diclorometano das folhas de *Verbesina subcordata* DC. foram separadas e identificadas a mistura de dois isômeros dos sesquiterpenos também do tipo eudesmano cinamato de 5-hidróxi-2-isopropil-4 α -metil-8-metilen-decaidronaftalen-1-ila (cinamato de 1-hidróxi-6-epi- β -verbesinol) e cinamato de 5-hidróxi-2-isopropil-4 α -metil-8-dimetil-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octaidronaftalen-1-ila (cinamato do 1-hidróxi-6-epi- α -verbesinol), já anteriormente descrita para espécies do gênero *Verbesina* L.

- Do extrato etanólico de *Banara parviflora* (A.Gray) Benth. foram isolados e identificados três componentes, um terpeno bastante comum em plantas (fitol) um flavonóide C-glicosídeo já encontrado em diversas famílias (orientina) e um alcalóide, derivado da espermidina, N¹,N⁸-dibenzoilespermidil-N⁴-acetamida de estrutura inédita. A presença desses compostos não foi descrita anteriormente para espécies desse gênero.

8 REFERÊNCIAS

ALEMAYEHU, G.; ABEGAZ, B.; SNATZKE, G.; DUDDECK, H. Bianthraquinones and a spermidine alkaloid from *Cassia floribunda*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3255-3258, 1988.

AUBLET, J.B.C.F. **Histoire des Plantes de la Guiane Française**. Londres, Paris: Pierre-François Didot jeune, v.1, 1775, p. 547-548.

BENTHAM, G. Notes in Bixaceae and Samydaceae. In: **Journal of the Proceedings of the Linnean Society**, v. 5, 1861, p. 90-92. versão online: botanicus.org; Acesso em 12/12/2009.

BERGERON, R.J.; McGOVERN, K.A.; CHANNING, M.A. BURTON, P.S. Synthesis of N⁴-Acylated N¹,N⁸-Bis (acyl) spermidines: An Approach to the Synthesis of Siderophores. **Journal of Organic Chemistry**, v. 45, p. 1589-1592, 1980.

BIENZ, S.; BISEGGER, P.; GUGGISBERG, A.; HESSE, M. Polyamine alkaloids. **Natural Products Reports**, v. 22, p. 647-658, 2005.

BREITMAIER, E. **Terpene – Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone**. Leipzig: B.G. Teubner Stuttgart. 1999. p.37-39

BOHLMANN, F.; FRITZ, U.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Sesquiterpene and diterpene derivatives from *Solidago* species. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2655-2661, 1980.

BOHLMANN F.; GUPTA, R.K.; JAKUPOVIC, J.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Furanoheliangolideos and farnesol derivatives from *Calea hispida*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2899-2903, 1982.

BRUNO-COLMENAREZ, J.; AMARO-LUIS, J.M.; RAMÍREZ, I.; DELGADO-MÉNDEZ, P.; DELGADO, G.D. Absolute Configuration of Two Eudesmane Derivatives from *Verbesina turbacensis* H.B.K. **Journal of Chemical Crystallography**, v. 40, p. 110-115, 2010.

CANALES, M.; HERNÁNDEZ, T.; CABALLERO, J.; ROMO DE VIVAR, A.; AVILA, G.; DURAN, A.; LIRA, R. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 429-439, 2005.

CARMIGNANI, M.; VOLPE, A.R.; BOTTA, B.; ESPINAL, R.; DE BONNEVAUX, S.C.; DE LUCA, C.; BOTTA, M.; CORELLI, F.; TAFI, A.; SACCO, R.; DELLE MONACHE, G. Synthesis and Pharmacology of (3,4-Dimethoxycinnamoyl)- N^1 -agmatine and Synthetic Analogues. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 18, p. 2950-2958, 2001

CASTEEL, D. A. Peroxy natural products. **Natural Products Reports**, v. 16, p. 55-73, 1999.

CASTILLO DEL, J. B.; MANRESA FERRERO, M. T.; RODRÍGUEZ LUIS, F.; VÁZQUEZ BUENO, P. Salvadorian Compositae. II. Juanislamin and 2,3 – Epoxy-juanislamin. Two new sesquiterpenic lactones from *Calea urticifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 3, p. 348-250, 1981.

CHASE, M.W.; ZMARZTY, M.D.; LLEDO, K.J. WURDACK, K.J.; SWENSEN, S.; FAY, F. When in doubt, put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid rbcL DNA sequences. **Kew Bulletin**, v.57, p.141-181, 2002.

CHATURVEDULA, V.S.P.; FAROOQ, A.; SCHILLING, J.K.; MALONE, S.; DERVELD, I.; WERKHOVEN, M.C.M.; WISSE, J.H.; RATSIMBASON, M.; KINGSTON, D.G.I. New Eudesmane Derivatives from *Melampodium caphoratum* from the Suriname Rainforest. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2053-2057, 2004.

DAI, J.; LIU, Y.; ZHOU, Y.D.; NAGLE, D.G. Hypoxia-Selective Antitumor Agents: Norsesiterpene Peroxide from the Marine Sponge *Diacarnus levii* Preferentially Suppress the Growth of Tumor Cells under Hypoxic Conditions. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 130-133, 2007.

DEMBITSKY, V.M. Bioactive peroxides as potential therapeutic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.43, p. 223-251, 2008.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2. ed. New York: Wiley & Sons, 2002.

EFFERTH, T.; DUNSTAN, H.; SAUERBREY, A.; MIYACHI, H.; CHITAMBAR, C.R. The anti-malarial artesunate is also active against cancer. **International Journal of Oncology**, v.18, n.4, p.767-773, 2001.

EFFERTH, T.; MARSCHALL, M.; WANG, X.; HUONG, S.M.; HAUBER, I.; OLBRICH, A.; KRONSCHNABL, M.; STAMMINGER, T.; HUANG, E.S. Antiviral activity of artesunate towards wild-type, recombinant, and ganciclovir-resistant human cytomegaloviruses. **Journal of Molecular Medicine**, v. 80, n. 4, p. 233-242, 2002.

FERREIRO, Z.S.; ROQUE, N.F.; GOTTLIEB, O.R.; OLIVEIRA, F.; GOTTLIEB, H.E. Structural clarification of germacronolides from *Calea* species. **Phytochemistry**, v. 19, p. 1481-1484, 1980.

GARDNER, P.D.; PARK, G.J.; ALBERS, C.C. α - and β - Verbesinol, Sesquiterpene Alcohols of the *cis*- Decalin Series. **Journal of American Chemical Society**, v. 83, n. 6, p. 1511-1512, 1961.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; DE QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L.; VAN DEN BERG, C. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. **Conservation Biology**, v.19, n.3, p.632-9, 2005.

GREUTER, W. McNEILL, J. BARRIE, F.R.; BURDET, H.M.; DEMOULIN, V.; FILGUEIRAS, T.S. NICOLSON, D.H.; SILVA, P.C.; SKOG, J.; TREHANE, P.; TURLAND, N.J.; HAWKSWORTH, D.L. International code of botanical nomenclature (Saint Louis Code). **Regnum Vegetabile**, v.138, 2000.

GALVANI, F.R.; BAPTISTA, L.R.M. Flora do Parque Estadual do Espinilho – Barra do Quaraí/RS. **Revista da FZVA**, v.10, n.1, p.42-62, 2003.

GUERRERO, M.F.; PUEBLA, P.; CARRÓN, R.; MARTÍN, M.L.; ARTEAGA, L.; SAN ROMÁN, L. Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 37-42, 2002.

HEINZMANN, B.M. **Inhaltsstoffe aus *Senecio selloi* Spreng. De Candolle**. 1996. 149p. Tese (Doutorado em Ciências Naturais e Exatas - Química Farmacêutica), Universität Bonn, Alemanha, 1996.

HERZ, W.; KUMAR, N.; BOUNT, J.F. Crystal Structure and Stereochemistry of Verbesindiol. **Journal of Organic Chemistry**, v.47; p.1785-1786, 1982.

HLAVKA, J.J.; BITHA, P.; BOOTHE, J.; FIELDS, T. Glycocinnamoylspermidines, a new class of antibiotics IV. Chemical modification of LL-BM123γ. **The Journal of Antibiotics**, v. 31, n. 5, p. 477-479, 1978.

HOLZWARTH, M.; TRENDL, J.M.; ALBRECHT, P.; MAIER, A.; MICHAELIS, W. Cyclic Peroxides Derived from the Marine Sponge *Plakortis simplex*. **Journal of Natural Products**, v.68, p.759-761, 2005.

HUBER, H.; FRÖLKE, E. A new spray-reagent for the detection and quantitative estimation of peroxides. **Chromatographia**, v. 5, n. 4, p. 256-257, 1972.

JAKUPOVIC, J.; ELLMAUERER, E.; BOHLMANN, Y.J.F.; DOMINGUEZ, X.A.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Further Eudesmane Derivatives from *Verbesina* Species. **Planta Medica**, v.53, n.1, p.39-42, 1987.

JIMÉNEZ, M.S.; GARZÓN, S.P.; RODRÍGUEZ, A.D. Plakortides M and N, Bioactive Polyketide Endoperoxides from the Caribbean Marine Sponge *Plakortis halichondrioides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 655-661, 2003.

JIN, H.X.; LIU, H.H.; ZHANG, Q; WU, Y. On the Susceptibility of Organic Peroxy Bonds to Hybrid Reduction. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, p. 4240-4247, 2005.

KAPTEIN, S.J.F.; EFFERTH, T.; LEIS, M.; RECHTER, S.; AUEROCHS, S.; KALMER, M.; BRUGGEMAN, C.A.; VINK, C.; STAMMINGER, T.; MARSCHALL, M. The anti-malaria drug artesunate inhibits replication of cytomegalovirus *in vitro* and *in vivo*. **Antiviral Research**, v. 69, n. 2, p. 60-69, 2006.

KIUCHI, F.; ITANO, Y.; UCHIYAMA, N.; HONDA, G.; TSUBOUCHI, A.; NAKAJIMA-SHIMADA, J.; AOKI, T. Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 4, p. 509-512, 2002.

KONECKI, D.; KRAMER, G.; PINPHANICHAKARN, P.; HARDESTY, B. Polyamines are necessary for maximum *in vitro* synthesis of globin peptides and play a role in chain initiation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 169, n. 1, p. 192-198, 1975.

KWON, H.C.; CHOI, S.U.; LEE, K.R. Cytotoxic peroxides from *Artemisia stolonifera*. **Archives of Pharmaceutical Research**, v.23, n.2, p.151-154, 2000.

LOBITZ, G. O.; HEILMANN, J.; ZSCHOCKE, S.; TAMAYO-CASTILLO, G.; BAUER, R.; MERFORT, I. Bornyl cinnamate derivatives with antiinflammatory activity from *Verbesina turbacensis*. **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, v. 8, n. 3, p. 115-118, 1998

MALDONADO, E.; MÁRQUEZ, C.L.; ORTEGA, A. A thymol derivative from *Calea Nelsonii*. **Phytochemistry**. v. 31, n. 7, p. 2527-2528, 1992.

MAREK, A.M.E. **Peroxide und andere Inhaltsstoffe aus Heterothalamus-Arten und malariawirksame Abwandlungsprodukte Peroxid**. 1994. Tese (Doutorado em Ciências Naturais e Exatas - Química Farmacêutica), Universität Bonn, Alemanha, 1994.

MARTÍNEZ, M.V.; SÁNCHEZ, A.F.; JOSEPH-NATHAN, P. Thymol derivatives from *Calea nelsonii*. **Phytochemistry**. v. 26, n. 9, p. 2577-2579, 1987.

MESHNICK, S.R.; TAYLOR, T.E.; KAMCHONWONGPAISAN, S. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. **Microbiological Reviews**, v.60, n.2, p.301-315, 1996.

MEURER, B.; WRAY, V.; GROTHJAHN, L.; WIERMANN, R.; STRACK, D. Hydroxycinnamic acid spermidine amides from pollen of *Corylus avellana* L. **Phytochemistry**, v.25, n.2, p.433-435, 1986.

MORS, W.B., RIZZINI, C.T., PEREIRA, N.A. **Medicinal Plants of Brazil**. Algonac: Reference Publications, 2000, p. 57.

NASCIMENTO, A.M.; SALVADOR, M. J.; CANDIDO, R.C.; ITO, I, Y.; OLIVEIRA, D.C.R. Antimicrobial activity of extracts and some compound from *Calea platylepis*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 514-519, 2004.

NASCIMENTO, A.M.; SILVA, F.S.; OLIVEIRA, D.C.R. Constituents of *Calea platylepis* Sch. Bip. Ex Baker. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 993-996, 2002.

NASCIMENTO, A.M.; OLIVEIRA, D.C.R. A new 5-deoxyflavone from the aerial parts of *Calea clauseniana*. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 1261-1263, 2007.

OBER, A.G.; QUIJANO, L.; FISCHER, N.H. Eudesmanolides, trichomatolides B-E, and a heliangolide from *Calea trichomata*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 7, p. 1439-1443, 1984.

OBER, A.G.; FRONCZEK, F.R.; FISCHER, N.H. Three benzofurans and a 1, 4-dioxin derivative from *Calea* species: The molecular structures of Calebertin and Caleteucin. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 2, p. 242-248, 1985.

OELRICHS, P.B.; VALLELY, P.J.; MACLEOD, J.K.; LEWIS, I.A.S. Isolation of Galegine from *Verbesina encelioides*. **Journal of Natural Products**, v.44, p. 754-755, 1981.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.5, 1978.

PRUSKI, J.F.; URBATSCH, L.E. Five new species of *Calea* (Compositae: Heliantheae) from planaltine Brazil. **Brittonia**, v. 40, n. 4, p. 341—356, 1988.

RIBEIRO, V.L.S.; AVANCINI, C.; GONÇALVES, K.; TOIGO, E.; POSER, G. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary Parasitology**, v. 151, p. 351-354, 2008.

RÜCKER, G.; WALTER, R.D.; MANNS, D.; MAYER, R. Antimalarial activity of some natural peroxides. **Planta Medica**, v.37, n.3, p.295-296, 1991.

RÜCKER, G.; SCHENKEL, E.; MANNS, D.; FALKENBERG, M.; MAREK, A. Peroxides and other constituents from *Heterothalamus alienus*. **Phytochemistry**, v.41, n.1, p.297-300, 1996a.

RÜCKER, G.; SCHENKEL, E.P.; MANNS, D.; MAYER, R.; HEIDEN, K.; HEINZMANN, B.M. Sesquiterpene peroxides from *Senecio selloi* and *Eupatorium rufescens*. **Planta Medica**, v.62, n.6, p.565-566, 1996b.

RÜCKER, G. Peroxides as constituents of medicinal plants. **Caderno de Farmácia**, v.13, n.2, p.79-83, 1997.

RÜCKER, G.; MANNS, D.; SCHENKEL, E.P.; HARTMANN, R.; HEINZMANN, M.B. Triterpene ozonide from *Senecio selloi*. **Archiv der Pharmazie**, v.336, n.4/5, p.205-207, 2003.

SALMÓN, M.; SORIANO-GARCÍA, M.; TOSCANO, R.A.; CÁRDENAS, J.; MIRANDA, R.; VARGAS, F.; ANGELES, E. Verocephol, a Unique Amorphane Sesquiterpene γ -Lactol. **Journal of Organic Chemistry**, v. 50, p. 4171-4172, 1985.

SATTAR, E.A.; GLASL, H.; NAHRSTEDT, A.; HILAL, S.H.; ZAKI, A.Y.; EL-ZALABANI, S.M.H. Hydroxycinnamic acid amides from *Iochochroma cyaneum*. **Phytochemistry**, v. 29, n.12, p. 3931-3933, 1990.

SCHENKEL, E. P., RÜCKER, G., MANNS, D., FALKENBERG, M. B., MAZENBACHER, N. I., SOBRAL M, MENTZ, L. A., BORDIGNON, S. A. L., HEINZMANN, B. M. Screening of Brazilian

plants for the presence of peroxides. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. São Paulo: v.38, n.2, p.191 - 196, 2002.

SMITH, B.C. **Infrared spectral interpretation: A Systematic Approach**. Boca Raton: CRC Press, 1999, p.126-130.

SOBRAL, M.; JARENKOW, J. A.; BRACK, P.; IRGANG, B.; LAROCCA, J.; RODRIGUES, R.S. **Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil**. São Carlos: RiMa: Novo Ambiente, 2006. p 147 e 148.

SOEJARTO, D.D.; FONG, H.H.; TAN, G.T.; ZHANG, H.J.; MA, C.Y.; FRANZBLAU, S.G.; GYLLENHAAL, C.; RILEY, M.C.; KADUSHIN, M.R.; PEZZUTO, J.M.; XUAN, L.T.; HIEP, N.T.; HUNG, N.V.; VU, B.M.; LOC, P.K.; DAC, L.X.; BINH, L.T.; CHIEN, N.Q.; HAI, N.V.; BICH, T.Q.; CUONG, N.M.; SOUTHAVONG, B.; SYDARA, K.; BOUAMANIVONG, S.; LY, H.M.; THUY, T.V.; ROSE, W.C.; DIETZMAN, G.R. Ethnobotany/ethnopharmacology and mass bioprospecting: issues on intellectual property and benefit-sharing. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.1/2, p.15-22, 2005.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. p.333.

STEINBECK, C.; SPITZER, V.; STAROSTA, M.; POSER, G. Identification of two Chromenes from *Calea serrata* by semiautomatic structure elucidation. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 627-628, 1997.

THADEO, M. **Anatomia foliar de espécies de Flacourtiaceae**. Viçosa: Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal de Viçosa, 2007. (Tese de Doutorado)

TOLSTIKOV, G.A.; TOLSTIKOV, A.G.; TOLSTIKOVA, O.V. Natural peroxides. Chemistry and biological activity. **Russian Chemical Reviews**, v.65, n.9, p.769-783, 1996.

VENDRUSCOLO, G. S.; SIMÕES, C. M. O. ; MENTZ, L. A. Etnobotânica no Rio Grande do Sul: análise comparativa entre o

conhecimento original e atual sobre as plantas medicinais nativas. **Pesquisas Botânica, São Leopoldo, RS**, v. 56, p. 285-320, 2005.

VENDRUSCOLO, G. S. ; MENTZ, L. A. Levantamento etnobotânico das plantas utilizadas como medicinais por moradores do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia. Série Botânica**, v. 61, p. 83-103, 2006.

VIGNERON, M.; DEPARIS, X.; DEHARO, E.; BOURDY, G. Antimalarial remedies in French Guiana: A knowledge attitudes and practices study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, p.351-360, 2005.

XU, W.H.; JACOB, M.R.; AGRAWAL, A.K.; CLARK, A.M.; LIANG, Z.S.; LI, X.C. Verbesinoides A-F, 15,27- Cyclooleanane Saponins from the American Native Plant *Verbesina virginica*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1022-1027, 2009.

YAMADA, M.; MATSUURA, N.; SUZUKI, H.; KUROSAKA, C.; HASEGAWA, N.; UBUKATA, M.; TANAKA, T.; IINUMA, M. Germacranolides from *Calea urticifolia*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3107-3111, 2004.

WAGNER, H. BLADT, S. **Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2. Ed. Berlin: Springer, 1996.

ZUCOLOTTO, S.M. **Estudo fitoquímico das folhas, frutos e raízes de *Passiflora edulis* forma *flavicarpa* Degener**. Florianópolis: Programa de pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, 2005. (Dissertação de Mestrado)

Apêndice 1. Artigo a ser submetido à revista Química Nova.

Alcaloide derivado da espermidina isolado da espécie *Banara parviflora* (A. Gray) Benth. (Salicaceae).

Maria Izabel Goularte Moritz; Lara Almida Zimmermann; Jorge Alejandro Palermo; Gabriela Cabrera; Eloir Paulo Schenkel*¹

Laboratório de Química Farmacêutica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade

88040-970 Florianópolis, SC, Brazil

ABSTRACT:

Banara parviflora (A. Gray) Benth. (Salicaceae) known as “farinha seca” is distributed between Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, in Brazil. The ethanolic extracts obtained from the leaves of *B. parviflora* were analyzed by chromatographic methods and the fractionation of the extracts resulted in isolation and identification of a new compound, a spermidin alkaloid derivative, a new compound not yet related. Identification of this compound was achieved based on IR, EM, ¹H, ¹³C e 2-D NMR data.

Keywords: Salicaceae, *Banara parviflora* (A. Gray) Benth., spermidine alkaloid.

*¹ eloirschinkel@gmail.com

Introdução

A família Salicaceae possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 50 gêneros e 1000 espécies. A maioria dos gêneros de Salicaceae que ocorrem no Brasil é formada por poucas espécies e possuem distribuição restrita, à exceção de espécies do gênero *Casearia* e *Xylosma* e, em menor escala *Banara*, *Ryania*, *Prockia* e *Laetia*¹.

O gênero *Banara* foi classificado inicialmente como pertencente à família Flacourtiaceae (Prockieae), posteriormente foi inserido na família Salicaceae, em 2002 com base em estudos morfológicos e moleculares^{2,3}.

O gênero *Banara* Aubl., descrito em 1775 por Aublet, abrange cerca de 64 espécies distribuídas principalmente na América do Sul. A espécie *Banara parviflora* (A. Gray) Benth. é nativa do Rio de Janeiro ao Rio Grande do sul e é conhecida popularmente no Rio Grande do Sul como farinha seca³.

Derivados da espermidina há tempos tem sido de interesse da química orgânica e da bioquímica. Dentre as atividades biológicas descritas, derivados do alcaloide espermidina apresentaram ação queladora de ferro, antimicrobiana e efeitos na síntese do DNA na iniciação peptídica^{4,5}.

Este trabalho descreve o isolamento e elucidação estrutural de uma nova substância derivada da espermidina de *B. parviflora* e contribui com dados espectrais para a caracterização desses alcaloides, ressaltando que para espécies do gênero *Banara* não foram localizados estudos químicos na literatura.

Parte Experimental

Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos em um aparelho IR Prestige-21 FTIR-8400 S (Shimadzu) utilizando-se KBr. Os espectros de RMN foram obtidos em CDCl_3 em um aparelho Bruker AM 500 (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz). Os espectros de massas de alta resolução com fotoionização em pressão atmosférica (APPI) foram obtidos em espectrômetro Bruker MicroTOF-Q II em modo positivo. Para CCD foram utilizadas sílica gel 60 F256 (Merck®). Para as colunas cromatográficas foram utilizadas sílica gel 60 (0,04-0,063 mm; 0,063-0,2 mm), carvão ativado (Nuclear®) e gel de permeação molecular Sephadex LH-20 (GE Healthcare®). Em CCD, as substâncias foram evidenciadas pelo uso de lâmpadas de ultravioleta (UV) sob comprimentos de onda de 254 e 366 nm, e pela utilização de reagente de revelação Dragendorff (para revelação de compostos nitrogenados). Para a análise por CLAE, foi utilizado o Cromatógrafo Shimadzu SCL-10A, bombas do modelo LC-10AD e detector ultravioleta SPD-10AV. Foram

utilizados metanol e acetonitrila grau HPLC (MTedia®) e água Milli-Q (Millipore®). A coluna utilizada foi coluna preparativa Shim-pack ODS 10 mm, 250 mm x 21.2 mm e membranas (Millipore®) de 0,45 µm para purificação da fase móvel e das amostras.

Material vegetal

As folhas de *B. parviflora* foram coletadas em janeiro de 2009 no Município de Taquarí no Rio Grande do sul e secas em temperatura ambiente.

Extração e isolamento

As folhas frescas após moídas em moinho de facas foram submetidas à extração com etanol 96° por sete dias. Foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório com temperatura inferior a 40°C resultando em extrato etanólico de folhas *B. parviflora* (15 g). O extrato etanólico, em forma de pó, foi submetido a fracionamento em coluna sob vácuo utilizando como fase móvel os solventes hexano e acetato de etila em gradiente da seguinte forma: 200 mL de cada fração contendo 100% de hexano, 90% hexano: 10% acetato de etila, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 50% acetato de etila: 50 % metanol e 100 % metanol como fase móvel. Foram obtidas oito frações, sendo que a última (metanol) de maior massa (9g), foi utilizada para realização de uma coluna de separação com carvão ativado e sílica utilizando-se 200 mL

de metanol e metanol:acetonitrila (50:50, v/v) como fase móvel. A fração metanólica (234 mg) foi submetida à Sephadex LH-20 em metanol originando frações que foram reunidas em PS20-25 (8,2 mg) e PS60 (4,6 mg) e posteriormente purificadas em CLAE preparativo (Fase móvel: acetonitrila: metanol: água Milli-Q (30:30:40, V/V/V); fluxo 3 mL/min; detecção em 230 nm) resultando na substância B1, identificada através de métodos espectroscópicos como N¹,N⁸-dibenzoilespermidil-N⁴-acetamida (figura 1) e no flavonóide C-glicosilado orientina (figura 2).

N¹,N⁸-dibenzoilespermidil-N⁴-acetamida (Substância B1): Substância oleosa; IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$ em cm⁻¹) 3410, 1643, 1635, 1456, 1309, 615. EM/APPI [M+H]⁺: m/z 396,23313 (C₂₃H₃₀N₃O₃⁺); experimento EM/EM da molécula protonada 396,23313 (C₂₃H₃₀N₃O₃⁺): m/z 354,21780 (C₁₀H₂₀NO⁺); m/z 336,20729 (C₂₁H₂₆N₃O⁺); m/z 275,17879 (C₁₆H₂₃N₂O₂⁺); m/z 233,16672 e m/z 162,09337 (C₁₀H₁₂NO⁺). RMN: dados de RMN na tabela 1.

Resultados e Discussão

A substância B1 foi obtida na forma de um óleo viscoso e esbranquiçado e foi submetido à análise espectroscópica (IV, EM e RMN).

No espectro de IV da substância apresentou a banda de absorção característica de NH (3410 cm^{-1}). A banda em 1309 cm^{-1} pode ser atribuída a estiramento da ligação C-N. Na região entre 1680-1630, característica de carbonilas de amida pode-se observar duas bandas de absorção, uma em 1643 cm^{-1} e outra em 1635 cm^{-1} . A absorção máxima no ultravioleta foi observada em 232 nm utilizando metanol como solvente.

A fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3$ foi deduzida pela espectrometria de massas de alta resolução (APPI) pelo pico da molécula protonada m/z 396,23313, o que corresponde a 11 insaturações na molécula.

Os espectros de ^{13}C evidenciam a presença de 23 átomos de carbono, dos quais três carbonos são de carbonilas (δ_{C} 171,8; 168,0 e 167,6), 12 carbonos de anel aromático e 7 carbonos de CH_2 . Alguns sinais do espectro de RMN ^1H não apresentam correlação de HSQC-DEPT 135° e considerando as informações do espectro de infravermelho e massas, podem ser atribuídos aos hidrogênios ligados a nitrogênios, especificadamente δ_{H} 6,85 e δ_{H} 7,92 (tripletos alargados).

Na análise dos espectros de RMN de ^1H foi observada, em δ_{H} 2,13, a presença de um singlete (3H) que, por estar em uma região de desblindagem, pode ser atribuído a uma metila ligada a carbonila. Essa

metila está correlacionada por HSQC com o carbono assinalado como δ_C 21,3.

O espectro de HH-COSY mostra os sinais referentes aos hidrogênios ligados ao nitrogênio (δ_H 6,85 e 7,92) correlacionando com hidrogênios metilênicos alifáticos (δ_H 3,47 e 3,37) (figura 3) e a presença de uma cadeia de 3 C e de 4 C separadas entre três nitrogênios característico de derivados da espermidina (figura 3). Dessa forma, os espectros de alta resolução, em conjunto com os dados de RMN e ainda as correlações H-C indicadas na figura 4, permitem propor a estrutura da substância B1 como N¹,N⁸-dibenzoileespermidil-N⁴-acetamida.

Agradecimentos

CNPq pelas bolsas concedidas. Ao Prof. Dr. Sérgio A. L. Bordignon pela coleta e identificação do material vegetal, Prof. Dra. Gabriela Cabrera pela realização dos espectros de massas e ao Prof. Dr. Jorge A. Palermo pela realização dos espectros de RMN (¹H, ¹³C e 2-D).

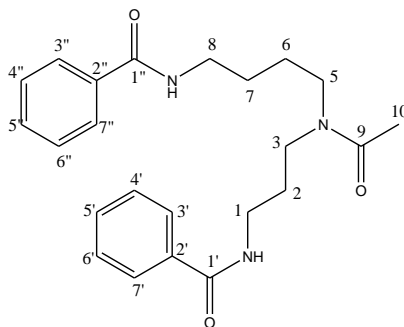


Figura 1: Estrutura do derivado da espermidina N¹,N⁸-dibenzoileespermidil-N⁴-acetamida isolado de *B. parviflora*.

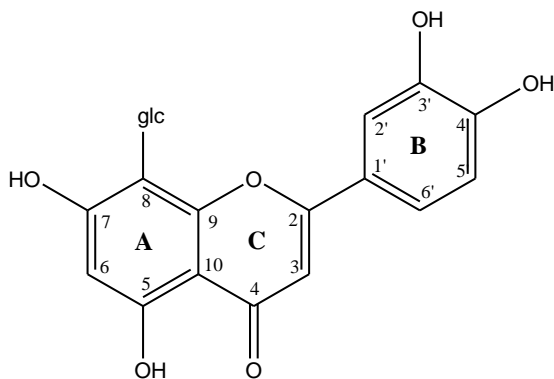


Figura 2: Estrutura do flavonóide C-glicosídeo orientina

Tabela 1: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da substância B1 (^1H : 500; ^{13}C : 125 MHz, CDCl_3 ; ppm)

^{13}C	<i>B1</i> (CDCl_3 ; 500 MHz – 125 MHz)	
	^{13}C	^1H
<i>1</i>	36,2	3,37
<i>2</i>	27,1	1,78
<i>3</i>	42,5	3,46 (t, 6,4)
<i>4</i>	-	-
<i>5</i>	48,4	3,32
<i>6</i>	26	1,68
<i>7</i>	27	1,65
<i>8</i>	39,1	3,47
<i>9</i>	171,8	-
<i>10</i>	21,3	2,13
$^8\text{C-NH}$	-	6,85
$^1\text{C-NH}$	-	7,93
<i>1'</i>	167,6	-
<i>2'</i>	134,2	-
<i>3'; 7'</i>	127,0	7,87
<i>4'; 6'</i>	128,5	7,43
<i>5'</i>	131,3	7,48
<i>1''</i>	168,0	-
<i>2''</i>	134,3	-
<i>3''; 7''</i>	126,8	7,77
<i>4''; 6''</i>	128,5	7,43
<i>5''</i>	131,5	7,50

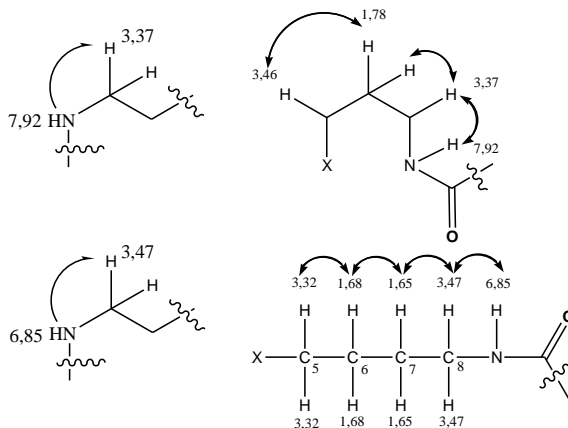


Figura 3: Correlações H-H por meio de experimentos de COSY para as estruturas parciais da substância B1

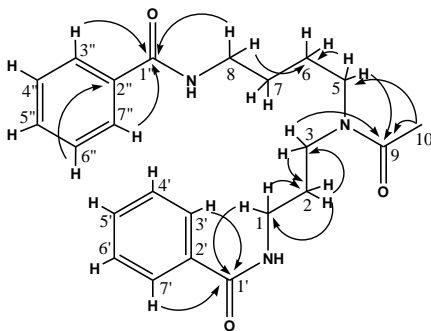


Figura 4: Correlações H-C por meio de experimentos de HMBC para a substância B1.

Referências

1. Souza, V.C.; Lorenzi, H. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.
2. Chase, M.W.; Zmarzty, M.D.; Lledo, K.J. Wurdack, K.J.; Swensen, S.; Fay, F. *Kew Bull.*, **2002**, 57, 141.
3. Sobral, M.; Jarenkow, J. A.; Brack, P.; Irgang, B.; Larocca, J.; Rodrigues, R.S. *Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil*, São Carlos: RiMa: Novo Ambiente, 2006.
4. Bergeron, R.J.; McGovern, K.A.; Channing, M.A. Burton, P.S. *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 1589.
5. Konecki, D.; Kramer, G.; Pinphanichakarn, P.; Hardesty, B. *Arch. Biochem. Bioph.*, **1975**, 169, 192.